

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO SOBRE
EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE (ORAC) Y EL PERFIL DE COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS DEL JUGO DE HUISCOYOL (*BACTRIS
GUINEENSIS*)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de
Alimentos

CAROLINA CORTÉS HERRERA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

.... a Emma Sandí Cortés,

Porque lo mejor de mi vida eres tú...

Agradecimientos

A Dios, Todopoderoso, le agradezco cada una de las bendiciones que me ha brindado, por ser Él mi guía en cada momento de mi vida.

Gracias a mi familia: Jorge A. Cortés H., Adriana Herrera R., José A. Cortés H., personas excepcionales, trabajadoras, luchadoras y amorosas que cada día se esfuerzan por ser mejores y que me enseñan que el sacrificio trae consigo muchas satisfacciones.

A Allan Sandí P., por el apoyo en este caminar juntos, en cual vamos cosechando nuevos éxitos y, por el amor, el cual es el motor que nos impulsa a seguir y a vivir cada momento de la caótica y hermosa aventura de ver crecer a Emma.

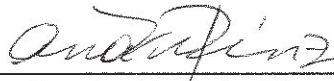
Durante este reto hay quienes con su carisma como personas, profesionales y amigos siguen dejado una huella muy profunda en mi corazón, y son el gran regalo del cielo, Graciela Artavia, Fabio Granados y Carlos Arias.

Por últimos agradezco a las personas que me mostraron su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, Dra. Ana Mercedes Pérez, Guy Lamoureux (Ph.D.), Alice Pérez (Ph.D.), Juan José Araya (Ph.D.), Dr. Fabrice Vaillant, mis compañeros del CITA, Eduardo, Deysilia, Randall, Silvia y Lizeth, así como a las asistentes de investigación Vanessa, Ana Irene y Aracelly, muchísimas gracias.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría en Ciencia de Alimentos."



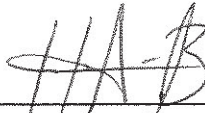
Dra. Alice L. Pérez Sánchez
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



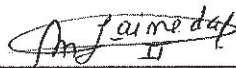
Dra. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Directora de Tesis



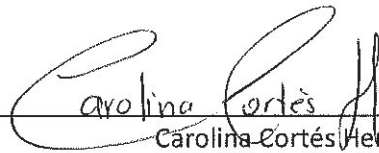
Dr. Fabrice Vaillant Barka
Asesor de Tesis



Ph.D. Juan José Araya Barrantes
Asesor de Tesis



M.Sc. María Lourdes Pineda Castro
Directora
Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos



Carolina Cortés Herrera
Candidata

Contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación	iv
Contenido	v
Resumen.....	viii
Lista de cuadros.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xii
1 JUSTIFICACIÓN	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 Compuestos polifenólicos	6
3.1.1 Clasificación de los compuestos polifenólicos	7
3.1.2 Métodos de determinación de polifenoles en matrices de alimentos	14
3.2 Importancia biológica de los polifenoles	17
3.2.1 Actividad frente al cáncer	18
3.2.2 Actividad cardioprotectora	20
3.2.3 Actividad antioxidante	21
3.3 Efecto del procesamiento en los compuestos polifenólicos	26
3.4 <i>Bactris guineensis</i> : el huiscoyol, un fruto no tradicional	28
4 METODOLOGÍA	31
4.1 Localización del proyecto	31
4.2 Materia prima	31
4.3 Determinación del perfil nutricional, composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC de la fruta fresca de huiscoyol	31
4.3.1 Diseño experimental y tratamiento estadístico	32
4.4 Efecto del procesamiento del jugo de huiscoyol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC.....	32

4.4.1	Procesamiento de la fruta fresca de huiscoyol para la obtención de jugo a escala laboratorio mediante cuatro diferentes tratamientos.....	33
4.4.2	Diseño experimental y análisis estadístico.....	36
4.5	Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC del jugo prensado de huiscoyol	36
4.5.1	Diseño experimental y análisis estadístico.....	37
4.6	Identificación de los compuestos polifenólicos mayoritarios de la fruta de huiscoyol y sus cambios producidos luego del procesamiento.	37
4.6.1	Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
4.7	Métodos de análisis químicos aplicados en la fruta fresca y en los jugos obtenidos de huiscoyol	38
4.7.1	Reactivos	39
4.7.2	Métodos de análisis	39
5	Discusión de resultados	43
5.1	Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC de la fruta fresca de huiscoyol para determinar su valor como alimento funcional.....	43
5.1.1	Características físicoquímicas del fruto de huiscoyol.....	43
5.1.2	Metabolitos primarios y secundarios analizados en la fruta fresca.....	47
5.1.3	Compuestos polifenólicos presentes en el fruto de huiscoyol	51
5.1.4	Capacidad antioxidante por el método ORAC.....	61
5.2	Efecto del procesamiento del jugo de huiscoyol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC.....	62
5.2.1	Generalidades del procesamiento del huiscoyol: rendimientos y características físicoquímicas del jugo.....	62
5.2.2	Efecto de operaciones unitarias del procesamiento de huiscoyol en el contenido de compuestos bioactivos.....	70
5.2.3	Contenido de polifenoles totales	71
5.2.4	Contenido de antocianinas totales	72
5.2.5	Vitamina C total.....	74
5.2.6	Efecto de operaciones unitarias en el procesamiento de huiscoyol en la actividad antioxidante determinada por el método ORAC	74
5.3	Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C) y la capacidad antioxidante por el método ORAC	

	del jugo prensado de huiscoyol para evaluar su valor como materia prima en la elaboración de productos funcionales.....	76
5.4	Determinación mediante la técnica de separación HPLC, los cambios a nivel semi-cuantitativo (aumento, disminución, aparición o desaparición) de las señales de algunos de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el fruto de huiscoyol y en los jugos obtenidos, con el fin de evaluar la estabilidad de estos biomarcadores	79
	<i>Valor p</i>	84
6	Conclusiones	86
7	Recomendaciones	89
8	Referencias.....	90
9	Anexos.....	102
9.1	Anexo 1. Determinación de las medidas físicas del fruto	102

Resumen

El presente trabajo se enfocó primeramente en la caracterización físicoquímica de un fruto no tradicional costarricense, el huiscoyol, cuyo nombre científico es *Bactris guineensis*. Este cultivo se localiza en la zona de Guanacaste, cerca de pantanos, ríos o playas de forma silvestre, y es consumido de forma directa, como fruta fresca. Se ha estudiado, de manera muy preliminar en trabajos previos, su contenido y tipo de antocianinas, el efecto de la temperatura sobre el contenido de polifenoles para realizar una infusión de esta fruta, y las actividades citotóxicas y pro-apoptóticas sobre células tumorales que posee el extracto de polifenoles del huiscoyol; pero se conoce muy poco sobre el contenido nutricional de este fruto. Además, no existen reportes del efecto del procesamiento para la obtención de jugo, sobre su contenido en compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante.

Se caracterizó, por tanto, el fruto de huiscoyol en lo que respecta a su composición física, como tamaño del fruto, porcentaje de pulpa y color, así como composición química-nutricional. Se determinó el contenido de humedad, cenizas, minerales, proteína, acidez, fibra dietética, carbohidratos totales y disponibles, presentes en seis lotes diferentes de huiscoyol cosechados en los años 2007, 2011, 2014 y 2015 de la zona de Palo Verde y Cañas. También se determinaron metabolitos primarios y secundarios, como el perfil de azúcares, perfil de ácidos orgánicos y compuestos bioactivos como vitamina C, polifenoles totales y antocianinas totales. Con base en lo anterior, se observó que el contenido nutricional es similar a frutas tradicionales de Costa Rica como cas, piña, guayaba, entre otros, pero, según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 de etiquetado nutricional, se puede considerar el huiscoyol como una buena fuente de fibra dietética ($7,3 \pm 2,5$ g/100 g). Cabe destacar que es un fruto cuya composición depende mucho de la zona en la cual se cultiva, así como de la época de cosecha; esto se vio reflejado en el contenido de vitamina C total, ya que en ciertos lotes la cantidad de esta vitamina fue no detectable, mientras que en otros lotes se obtuvo valores de 35-48 mg/100 g.

Con respecto al contenido de polifenoles totales (300-900 mg equivalentes de ácido gálico/100 g), antocianinas totales (30-50 mg equivalentes de cianidina-3-O-glucósido cianidina-3-O-glucósido /100 g) y capacidad antioxidante por el método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (700 -17 500 μ mol equivalentes de Trolox / 100 g), estos son comparables con los reportados en frutos con alto contenido de polifenoles como las bayas, entre las que se encuentran los arándanos, las moras, las fresas y las frambruesas. Se observó que el fruto de huiscoyol cultivado en Costa Rica presenta como componentes polifenólicos tentativos taninos hidrolizables y condensados, como procianidinas, derivados de catequinas y galocatequinas, además de derivados mono- y diglicosidados de kaemferol, así como antocianinas, siendo la mayoritaria la cianidin-3-O-rutinósido.

El perfil de compuestos polifenólicos se mantiene en el jugo prensado de huiscoyol, dichos compuestos son estables durante la aplicación de operaciones unitarias como la maceración enzimática y el tratamiento térmico. Se evidenció que el contenido de antocianinas y polifenoles no cambia significativamente con el tratamiento enzimático, y que esta maceración favorece la obtención de una mayor cantidad de jugo (52,8 %), comparado únicamente con la pulpa prensada sin tratar (48,6 %). Por otro lado, al aplicar un proceso térmico, se observó que no hay cambios significativos en el contenido de estos compuestos bioactivos, tanto de manera global como individual. Se genera, por lo tanto, un valor agregado al procesar el jugo de huiscoyol, el cual mantiene el valor de la fruta como alimento funcional, con una vida útil esperada que sea aceptable para el consumidor.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Condiciones de análisis por cromatografía líquida para la determinación de compuestos polifenólicos en diferentes matrices de alimentos.	16
Cuadro 2. Parámetros de peso y dimensiones del fruto (n= 10) y el color L*, a* y b* de la pulpa y cáscara (n= 6) de la fruta fresca de <i>Bactris guineensis</i>	43
Cuadro 3. Parámetros nutricionales determinados en la parte comestible (pulpa y cáscara) de la fruta de <i>Bactris guineensis</i> (n= 6) en base fresca.	45
Cuadro 4. Metabolitos primarios y secundarios identificados en la parte comestible (pulpa y cáscara) de la fruta de <i>Bactris guineensis</i> (n=6) en base fresca.	47
Cuadro 5. Principales señales de posibles compuestos polifenólicos presentes en un extracto acuoso de la fruta fresca huiscoyol analizados mediante UPLC-MS, ión molecular y su patrón de fraccionamiento tanto en modo negativo como positivo.	54
Cuadro 6. Rendimiento de despulpado de la fruta de huiscoyol a escala piloto.	64
Cuadro 7. Características fisicoquímicas generales (humedad, pH, grados Brix y acidez) de jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D) según el lote de producción con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% y resultado de la prueba de comparación de medias de Tukey, con un valor n= 3 para cada muestra y jugo.	68
Cuadro 8. Contenido de azúcares totales y ácidos orgánicos presentes en el jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo.	70
Cuadro 9. Contenido de polifenoles totales, antocianinas totales y vitamina C presentes en el jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), en base fresca con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo	71
Cuadro 10. Capacidad antioxidante del jugo prensado (A), jugo enzimado (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo enzimado y tratado térmicamente (D) en base fresca y base seca, con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo.	75
Cuadro 11. Composición química y nutricional del jugo prensado de huiscoyol.	77
Cuadro 12. Composición química y nutricional de diversos jugos de frutas.	79
Cuadro 13. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-MS en modo positivo presente en cada uno de los jugos de huiscoyol obtenidos con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo.	80
Cuadro 14. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-DAD positivo presente en un extracto de fruta fresca.	82
Cuadro 15. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-DAD positivo presente cada uno de los jugos de huiscoyol con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% para un n = 3 para cada jugo.	84

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras de algunos de los ácidos fenólicos.....	8
Figura 2. Estructura base de los flavonoides y sus respectivas familias.	9
Figura 3. Estructuras de algunos compuestos pertenecientes a la familia de las flavonas, flavanonas, flavanonoles y flavonoles.	11
Figura 4. Estructuras de algunos flavanoles.	12
Figura 5. Estructuras de algunas antocianinas.....	13
Figura 6. Estructura del resveratrol.	13
Figura 7. Estructura del secoisolariciresinol.	14
Figura 8. Efectos y actividades biológicas asociadas a los polifenoles.	18
Figura 9. Actividad frente al cáncer de algunos tipos de polifenoles.....	19
Figura 10. Clasificación de los antioxidantes según su actividad.	22
Figura 11. Palmera, racimo y fruto de <i>Bactris guineensis</i>	29
Figura 12. Flujo de proceso para la obtención de cuatro diferentes tipos de jugo de huiscoyol a escala piloto.	33
Figura 13. Frutos de huiscoyol según su estado de maduración a) verde, b) intermedio y c) maduro. Fuente: https://www.palmpedia.net/wiki/Bactris_guineensis	44
Figura 14. Cromatograma de separación de a) ácido cítrico, b) ácido málico y c) ácido succínico en una muestra de huiscoyol fresco (Lote 2014) por HPLC-DAD a 210 nm, 0,6 mL/min, 60 °C, H ₂ SO ₄ 2,25 mM.	48
Figura 15. Especies activas de la vitamina C y su equilibrio óxidoreductor.	49
Figura 16. Cromatograma de identificación y cuantificación de vitamina C en a) un extracto de huiscoyol, b) extracto de huiscoyol reducido y c) estándar de AA. Analizado por HPLC-DAD a 254 nm, 0,8 ml/min, 30 °C, H ₂ SO ₄ 18mM.	50
Figura 17 Cromatograma del estándar de cianidina-3-O-glucósido 10 ppm (rojo) y un extracto de huiscoyol (azul) analizado por HPLC-DAD a 512 nm, C18, 0,3 mL/min 35 °C, Fase A: HOCOOH 2%, Fase B ACN:H ₂ O 80:20	52
Figura 18. Perfil de compuestos polifenólicos presentes en un extracto de fruta fresca de huiscoyol separados por UPLC-MS A) en modo positivo y B) modo negativo.	53
Figura 19. Estructura de un derivado de kaempferol cuyos R1, R2 o R3 son las posiciones que pueden ser glicosidada.....	56
Figura 20 Patrón de fragmentación de la señal 1 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo positivo.....	56
Figura 21 Estructuras de procianidinas A) diméricas, B) triméricas y C) tetraméricas con sus posibles iones en modo negativo.....	58
Figura 22 Patrón de fragmentación de la señal 12 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo positivo.....	59
Figura 23. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento del pico correspondiente a la antocianina presente en el extracto de huiscoyol.	59
Figura 24 Patrón de fragmentación de la señal 6 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo negativo	60
Figura 25 Patrón de fragmentación de la señal 8 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo positivo.....	61
Figura 26 a) Pulpa y b) residuo del despulpado de huiscoyol.	64
Figura 27. Prensado de la pulpa de huiscoyol y obtención del jugo.	65
Figura 28. Masa de pulpa de fruta antes (A) y después (B) de la maceración enzimática.	66
Figura 29. Esterilización comercial de los jugos de huiscoyol a escala laboratorio.	67

<i>Figura 30. Valores promedio de a) humedad b) grados Brix, c) pH y d) acidez de los diferentes jugos de huiscoyol obtenidos a escala piloto, Jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), n=3.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 31. Variación del contenido de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C total) y la capacidad antioxidante ORAC de los diferentes jugos de huiscoyol obtenidos a escala piloto, Jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), n=3.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 32. Cromatograma del perfil de compuestos polifenólicos determinados por HPLC-DAD en un extracto de fruta fresca.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 33. Comparación de cromatogramas del perfil de compuestos polifenólicos determinados por HPLC-DAD en a) un jugo prensado de huiscoyol y b) un extracto de fruta fresca.</i>	<i>83</i>

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
Å	Angstrom
AA	Ácido ascórbico
AAPH	Cihidrocloruro de 2,2'-azobis-2-amidinopropano
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) -6-sulfónico
ADN	Acido desoxirribonucleico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BHA	Hidroxibutilanisol
BHT	Hidroxibutiltolueno
BSA	Solución de seroalbúmina bovina
CAT	Catalasa
CIPRONA	Centro de Investigación en Productos Naturales
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos
cm	Centímetros
Da	Dalton
DAD	Detector de arreglo de diodos
DPPH	Difenil-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio
EPR	Espectroscopia paramagnética de resonancia
ERYCA	<i>Erythrocyte Cellular Antioxidant Activity</i>
ESI-Q-TOF/MS	<i>Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramos
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GPx	Glutación peroxidasa
GST	Glutación sulfhidril transferasa
h	Hora
ha	Hectárea
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
H-ORAC	<i>Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
kg	Kilogramos
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MPA	Ácido metafosfórico
MS	Espectrometría de masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mV	Milivoltios
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
ppm	Partes por millón
REDOX	Reacciones de reducción-oxidación
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTCA	Reglamento técnico centroamericano
s	Segundo
SD	Desviación estándar
SOD	Superóxido dismutasa
SST	Sólidos solubles totales
TE	Equivalentes de Trolox
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
µmol	Micromoles
UCR	Universidad de Costa Rica
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
VRN	Valor de referencia de nutrientes
\bar{x}	Media



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Carolina Cortés Herrera, con cédula de identidad 1-1249-0186, en mi condición de autor el TFG titulado:

"Determinación del efecto del procesamiento sobre el contenido de compuestos bioactivos, capacidad antioxidante (ORAC) y el perfil de compuestos polifenólicos del jugo de Huiscoyol (*Bactris Guineensis*)"

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Carolina Cortés Herrera

Número de Carné: A31628 Número de cédula: 1 12490186

Correo Electrónico: carolina.cortesherrera@ucr.ac.cr

Número de teléfono: 88667956

Fecha: 02/03/2020

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dra. Ana Mercedes Pérez Carbajal


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1 JUSTIFICACIÓN

Las propiedades antioxidantes que pueden aportar fuentes naturales han sido uno de los principales focos de estudio en los últimos años; un compuesto químico puede servir como agente antioxidante si posee la capacidad de secuestrar radicales libres tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), inhibiendo la iniciación o propagación en sus reacciones de oxidación; estas especies pueden causar un enorme daño a nivel del ADN mitocondrial, lípidos, proteínas y a nivel genético de la célula (Naczek & Shahidi, 2003).

Dentro de la industria alimentaria existen dos categorías de antioxidantes. Por una parte, se tienen aquellos que son de origen sintético, tales como hidroxibutilanisol (BHA) e hidroxibutiltolueno (BHT), los cuales han sido utilizados desde los inicios del siglo XX, pero que poseen un efecto carcinógeno (Maestro & Borja, 1993). Por otra parte, se encuentran los antioxidantes de origen natural, tales como tocoferoles, ácidos fenólicos, alcaloides, los derivados de clorofila, aminoácidos, carotenoides, ácido ascórbico y polifenoles (Naczek & Shahidi, 2003).

Estos últimos compuestos están presentes en cáscaras, pulpas, y semillas, así como en productos derivados de frutas y vegetales, tales como bebidas, jugos, mermeladas, yogurt, helados y cereales, entre otros (Muñoz & Ramos, 2007). Existe una gran variedad de investigaciones sobre las actividades biológicas que pueden tener los compuestos polifenólicos, tanto a nivel de las plantas como en los animales. Desde el punto de vista de la estructura química, los polifenoles tienen la capacidad de capturar radicales libres generados como respuesta al aumento del estrés oxidativo, por lo que una ingesta diaria de frutas, verduras y granos enteros (que son ricos en polifenoles) podría generar una disminución en el riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares e inflamación crónica, así como enfermedades degenerativas, las cuales están relacionadas con el aumento del estrés oxidativo en la células (Tsao, 2010; Barberán, 2003; Nichenametla *et al.*, 2006; Zern & Fernández, 2005; Kondratyuk & Pezzuto, 2004; Wang *et al.*, 2011; Álvarez & Orallo, 2012).

Es por ello que los polifenoles, al estar presentes en productos de la dieta diaria como las frutas y vegetales, han generado una serie de investigaciones acerca de su estructura, aislamiento, metabolismo y biodisponibilidad; esta última propiedad, en el caso de los polifenoles naturales, es

muy variable, ya que depende del tipo de metabolito y de los procesos tecnológicos para la producción de los alimentos y de los hábitos alimentarios ([Manach et al., 2004](#)).

Diferentes investigaciones hacen referencia a la importancia del consumo de frutas y hortalizas que contengan una alta cantidad de compuestos con actividad antioxidante, ya que esta ha sido asociada en distintos estudios epidemiológicos con una disminución de síntomas provenientes de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o, inclusive podría, tener alguna incidencia sobre el desarrollo de cáncer ([Dembitsky et al., 2011](#); [Collins, 2005](#)). Los países tropicales producen una gran variedad de frutas y es factible pensar que algunas de ellas presenten una actividad antioxidante alta; por este motivo se han llevado a cabo distintos estudios para su determinación en frutas como mango, papaya, guayaba, mamón, carambola, piña, tamarindo, naranjilla, uvas, fresas y banano, entre otras ([Proteggente et al., 2002](#); [Wu et al., 2004a](#); [Wu et al., 2004b](#); [Wang et al., 1996](#); [Wang et al., 1997](#); [Patthamakanokporn et al. 2008](#); [Mahattanatawee et al., 2006](#)).

Wu y sus colaboradores (2004a, 2004b) desarrollaron una base de datos con las capacidades antioxidantes de componentes tanto lipofílicos como hidrofílicos, determinando también la cantidad de polifenoles totales en una serie de frutas y hortalizas como banano, piña, fresa, melón, kiwi, sandía, manzanas, uvas, arándanos, calabazas, así como sus valores por porción. A este trabajo se le une otra gran variedad de investigaciones que han evaluado dicha capacidad antioxidante utilizando los métodos de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), ABTS (*ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulphonico)*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) y DPPH (difenil-(2,4,6-trinitrofenil)iminoazanio), además de la determinación de polifenoles totales y de ácido ascórbico ([Patthamakanokporn et al., 2008](#); [Mahattanatawee et al., 2006](#)). Esta información sirve para conocer y ampliar la gama de alimentos que pueden tener propiedades funcionales y que aporten beneficios a la salud del ser humano.

En Costa Rica también se ha impulsado la investigación de la actividad antioxidante de algunas frutas tropicales no tradicionales; tal es el caso de la pitahaya ([Vaillant et al., 2005](#)) y de naranjilla ([Acosta et al., 2009](#)). En el 2012 se realizó un estudio de la capacidad antioxidante determinada por H-ORAC (*Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity*) y su correlación con la capacidad antioxidante a nivel celular empleando eritrocitos mediante el método ERYCA (*Erythrocyte Cellular Antioxidant Activity*) ([González et al., 2012](#)).

Uno de los frutos no tradicionales que podría ser objeto de estudio en nuestro país es el huiscoyol. Su nombre científico es *Bactris guineensis*, pertenece a la familia *Arecaceae* y entre sus nombres comunes están huiscoyol, viscoyol, güiscoyol y uvita de monte. La palma de donde se obtiene posee una altura de aproximadamente 3,5 m, sus hojas son de 0,2-0,5 m de largo con 20-42 piñas a ambos lados (Chízmár Fernández, 2009). Se puede encontrar desde Nicaragua hasta el norte de Colombia y Venezuela.

En Costa Rica, el cultivo de este fruto se ubica solo en la vertiente del Pacífico, en bosques secos o de transición, desde el norte hasta cerca de Barranca y Tivives, a una altitud desde 0 msnm hasta los 500-600 msnm al oeste de la Cordillera Volcánica en el Área de Conservación de Guanacaste. Es fácil encontrar arbustos en los márgenes de los caminos hacia Playa Blanca en el sector de Murciélagos y hacia Playa Potrero Grande en la zona de Santa Elena (Masís et al., 1998).

Algunos estudios atribuyen el color particular del huiscoyol a la presencia de compuestos polifenólicos pertenecientes a la familia de las antocianinas, las cuales, de acuerdo con Osorio y colaboradores (2010), fueron aisladas e identificadas por cromatografía de contracorriente y HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*); dichos investigadores señalaron la cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido como los componentes principales, además de otros pigmentos en pequeñas cantidades como la peonidina-3-rutinósido. Ese mismo grupo de investigadores en el 2011 realizó un estudio por medio de espectroscopía paramétrica de resonancia (EPR) para analizar la actividad captadora de radicales libres mediante los métodos ABTS y DPPH; estos autores observaron que un extracto rico en antocianinas provenientes del fruto presenta una mayor actividad liberadora de radicales con el método DPPH que con el método ABTS.

A raíz de que solamente existen hasta ahora muy pocos estudios sobre la caracterización parcial del fruto *Bactris guineensis* y la estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes, y considerando el potencial comercial de este cultivo, se ha planteado la presente investigación con el objetivo de determinar su valor como alimento funcional, tanto en la fruta fresca como en un jugo. Lo anterior con el fin de visualizar su uso como materia prima para la elaboración de productos de interés comercial. En este trabajo, una primera etapa correspondió a la caracterización nutricional completa del fruto fresco, mediante la determinación del aporte energético, contenido de fibra dietética, minerales, vitaminas, azúcares simples y ácidos orgánicos; además, se generó un perfil de los compuestos polifenólicos presentes y su actividad antioxidante. Seguidamente, se evaluó el efecto de diversos tipos de procesamiento de la fruta a escala piloto sobre los cambios a nivel de

compuestos bioactivos (compuestos polifenólicos, vitamina C), así como en su capacidad antioxidante. Finalmente, se desarrolló un flujo de proceso para poder obtener un producto con un alto contenido de compuestos bioactivos, que podría constituir una opción innovadora y alternativa de alimento funcional, para su elaboración a nivel nacional, logrando de esta manera agregar valor a frutos de nuestra biodiversidad que actualmente son sub-utilizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el impacto del procesamiento de la fruta de huiycoyol (*Bactris guineensis*) para la obtención de jugo, sobre el contenido de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C total), la capacidad antioxidante por el método ORAC y el perfil de compuestos polifenólicos.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar el perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C) y la capacidad antioxidante por el método ORAC de la fruta fresca de huiycoyol para determinar su valor como alimento funcional.
2. Analizar el efecto del procesamiento del jugo de huiycoyol sobre el contenido de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C) y la capacidad antioxidante por el método ORAC, con el fin de definir un flujo de proceso para una aplicación a escala industrial.
3. Determinar el perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C) y la capacidad antioxidante por el método ORAC del jugo prensado de huiycoyol para evaluar su valor como materia prima en la elaboración de productos funcionales.
4. Determinar mediante la técnica de separación HPLC-DAD los cambios a nivel semi-cuantitativo (aumento, disminución, aparición o desaparición) de las señales de algunos de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el fruto de huiycoyol y en los jugos obtenidos, con el fin de evaluar la estabilidad de estos biomarcadores durante el procesamiento de la fruta.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Compuestos polifenólicos

Los polifenoles corresponden a una de las familias de compuestos que están presentes mayoritariamente en frutas, vegetales y algunos productos derivados tales como jugos, mermeladas y pulpas. Estos compuestos son los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en los animales y el ser humano se debe a su ingestión ([Barberán, 2003](#)). Son sintetizados por las plantas y regulados cualitativa y cuantitativamente por factores genéticos, así como ambientales. Se han identificados más de 8 000 de estos compuestos en varias plantas y se le ha atribuido propiedades importantes a nivel de salud ([Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#)). Participan en la fase dependiente de la luz en la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones. Sus precursores son aminoácidos aromáticos tales como la fenilalanina y tirosina, así como unidades de acetato, los cuales pueden seguir la ruta metabólica del ácido shikímico y del fenilpropanoide ([Martínez *et al.*, 2002](#); [Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#)).

Los compuestos fenólicos y polifenólicos son parte esencial de diversas funciones fisiológicas de las plantas tales como pigmentación, polinización y resistencia contra depredadores. Algunos son fitoalexinas, cuya función es defender la planta de posibles ataques fúngicos o bacterianos, otros sirven como medio de protección contra radiaciones ultravioleta (UV), estrés fotosintético y especies reactivas de oxígeno; algunos flavonoides controlan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas ([Martínez *et al.*, 2002](#); [Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#)). La mayoría de las propiedades sensoriales como color, olor y sabor de algunas frutas y vegetales son atribuidas a derivados de compuestos polifenólicos.

Las antocianinas contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta y son las responsables de los colores rojo, anaranjado, azul, púrpura o violeta que encontramos en las cáscaras de varias frutas, vegetales e inclusive en la mayoría de las flores ([Robards *et al.*, 1999](#)). Los sabores particulares de amargor y astringencia son asociados a la presencia de compuestos fenólicos, siendo estos los responsables de brindarle una impalatabilidad a algunas plantas. Compuestos volátiles como la vainillina y el eugenol poseen una capacidad odorante muy fuerte ([Cheynier, 2005](#)).

Por otro lado, cuando los compuestos fenólicos sufren reacciones de oxidación dan lugar a productos conocidos como quinonas, las cuales son responsables de un color pardo que muchas veces es indeseable en frutas (Robards *et al.*, 1999).

En 1998 producto de los trabajos de Theodore White, Edgar Charles Bate-Smith, Tony Swain y Edwin Haslam se estipula la siguiente definición de polifenoles: *“son compuestos solubles en agua, que tienen una masa molecular comprendida entre 500 y 4 000 Da, que poseen de 12 a 16 grupos hidroxilos fenólicos sobre 5 o 7 anillos aromáticos por cada 1 000 Da de masa molecular”*. Se caracterizan por dar positiva la reacción de fenoles y precipitar alcaloides, así como gelatina y otras proteínas en solución (Quideau *et al.*, 2011). Con base en esta definición, existirían tres clases de polifenoles: las proantocianidinas conocidas como taninos condensados, los galotaninos y elagitaninos, considerados como taninos hidrolizables, y los florotaninos que se encuentran en las algas pardas. Pero existen compuestos más o menos complejos a los que se les adjudica el nombre de “polifenoles”, tales como las antocianinas, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, entre otros. Es por ello que Quideau *et al.* (2011) proponen que es más adecuado utilizar el término de polifenoles para referirse a aquellos compuestos que son metabolitos secundarios de las vías metabólicas del ácido shikímico y del fenilpropanoide y que posean más de un anillo fenólico.

A continuación, se describirá la clasificación de los compuestos polifenólicos más conocida con algunos ejemplos de cada una de las familias, así como las fuentes más representativas de los mismos.

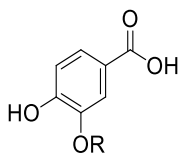
3.1.1 Clasificación de los compuestos polifenólicos

Existe una gran diversidad de compuestos que se encuentran ubicados en la familia de los polifenoles, desde las moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta moléculas complejas, tales como oligómeros de estilbenos, lignanos, galotaninos, elagitaninos. Los polifenoles se pueden encontrar en forma libre y en forma conjugada o ligada, asociados a uno o más azúcares simples mediante los grupos hidroxilos; dichos azúcares pueden ser monosacáridos, disacáridos e inclusive oligosacáridos (Cheynier, 2005; Álvarez & Orallo, 2012). También es posible encontrar polifenoles ligados de forma covalente a componentes estructurales de la pared celular, como celulosa, hemicelulosa, lignanos, pectina; estos se vuelven un poco más insolubles, lo que puede afectar su forma de absorción en el organismo (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

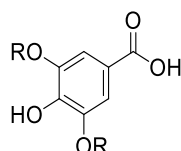
Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos polifenólicos no flavonoides que se pueden dividir en dos grandes grupos según su estructura base (Manach *et al.*, 2004). Se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos, tales como el ácido gálico, el ácido vanílico, ácido protocatecútico, así como los ácidos hidroxicinámicos, tales como el ácido caféico, el ácido clorogénico, el ácido p-coumárico y el ácido ferúlico (Tsao, 2010). Dichos compuestos representan una tercera parte de la familia de los polifenólicos presentes en la dieta; uno de los más frecuentes es el ácido cafeico, el cual se puede encontrar en manzanas, tomates y uvas (Robards *et al.*, 1999). Dichos compuestos pueden actuar como antioxidantes ya que funcionan como secuestradores de radicales (Kondratyuk & Pezzuto, 2004).

Derivados hidrobenzoicos

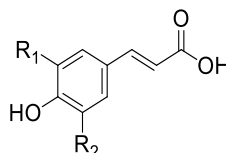


ácido protocatecúrico, R=H
ácido vanílico, R= OCH₃

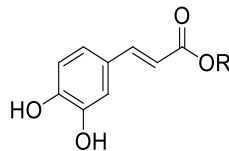


ácido gálico, R= H
ácido sirínico, R=OCH₃

Derivados hidrocinámicos



ácido p-cumárico: R₁ y R₂= H
ácido ferúlico: R₁ = H; R₂=OCH₃
ácido tinápico: R₁ y R₂= OCH₃



ácido caféico: R= H
ácido clorogénico: R = 5-quinol
ácido criptoclorogénico: R= 4-quinol
ácido neoclorogénico: R=3-quinol

Figura 1. Estructuras de algunos de los ácidos fenólicos.

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, corresponden a los polifenoles más abundantes y se encuentran en plantas vasculares, principalmente en las hojas y parte exterior de la planta (Martínez *et al.*, 2002). Todos estos compuestos poseen una unidad estructural base correspondiente a dos anillos aromáticos (A y B) separados de un heterociclo oxigenado, como se puede observar en la Figura 2, que se conoce como fenilbenzo-γ-pirona. El anillo A proviene del

metabolismo de resorcinol, mientras que el anillo B se deriva de la ruta del shikimato ([Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#)).

A partir de diversos grados de saturación, así como de sustitución en el anillo C, es posible tener varias clases de flavonoides, entre estos flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles y antocianinas, tal y como se puede observar en el Figura 2 ([Álvarez & Orallo, 2012](#); [Maestro & Borja, 1993](#)). Dichas estructuras base son conocidas como agliconas, pero en las plantas existen como glicósidos ([Tsao, 2010](#); [Robards *et al.*, 1999](#)).

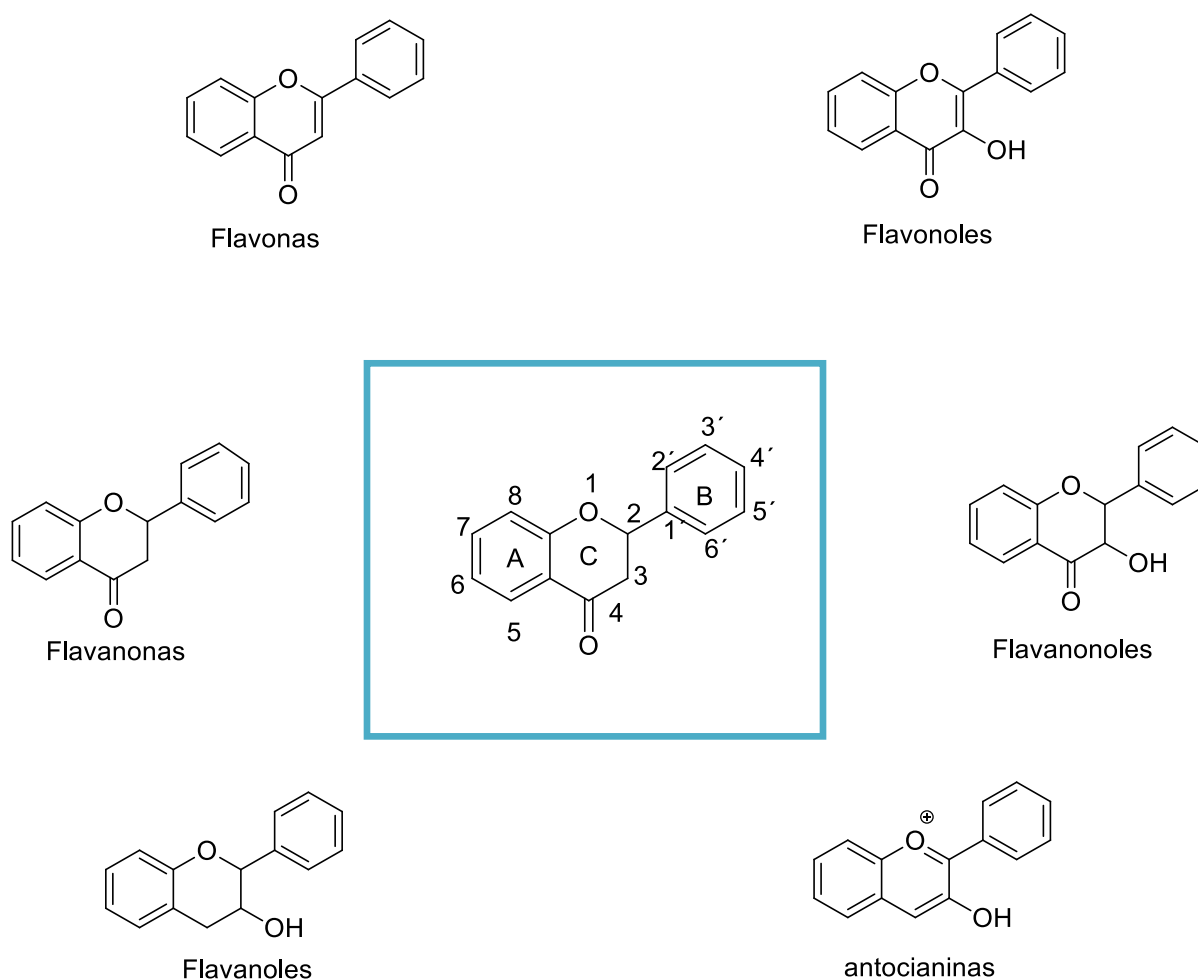


Figura 2. Estructura base de los flavonoides y sus respectivas familias.

Las flavonas no se encuentran frecuentemente en frutas, pero sí en cereales y en plantas herbáceas. El perejil y otras hierbas aromáticas como el romero y el tomillo contienen apigenina,

que junto con la luteolina (Robards *et al.*, 1999), son las flavonas más comunes; es posible encontrar glicósidos de flavonas en verduras y hortalizas, y en altas concentraciones pueden contribuir a la coloración de las plantas o ser responsables del sabor amargo, como la nobiletina y tageretina (Rivas & García, 2002; Tsao, 2010; Maestro & Borja, 1993).

Los flavonoles se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas con patrones de sustitución comúnmente encontradas en los anillos A y B con grupos hidroxilos en las posiciones 5 y 7 así como o 3' y 4'. Ejemplos de estos compuestos son quercetina, un compuesto amarillo verdoso presente en las cebollas, manzanas, brócoli, cerezas, uvas y repollo rojo, así como el kaempferol que se encuentra en puerros, brócoli, rábanos y remolacha roja (Martinez *et al.*, 2002; Tsao, 2010; Maestro & Borja, 1993).

Las flavanonas, también llamadas dihidroflavonas, poseen propiedades ópticas provenientes de la estereoquímica presente en el carbono 2 (Maestro & Borja, 1993). Corresponden a un grupo muy reducido de flavonoides que aparecen en alimentos, la mayoría se encuentra en alimentos cítricos, tal es el caso de la hesperidina que se localiza en la naranja y el limón, así como la naringina, la cual provee el sabor amargo de la toronja y a la naranja agria (Robards *et al.*, 1999; Tsao, 2010; Maestro & Borja, 1993).

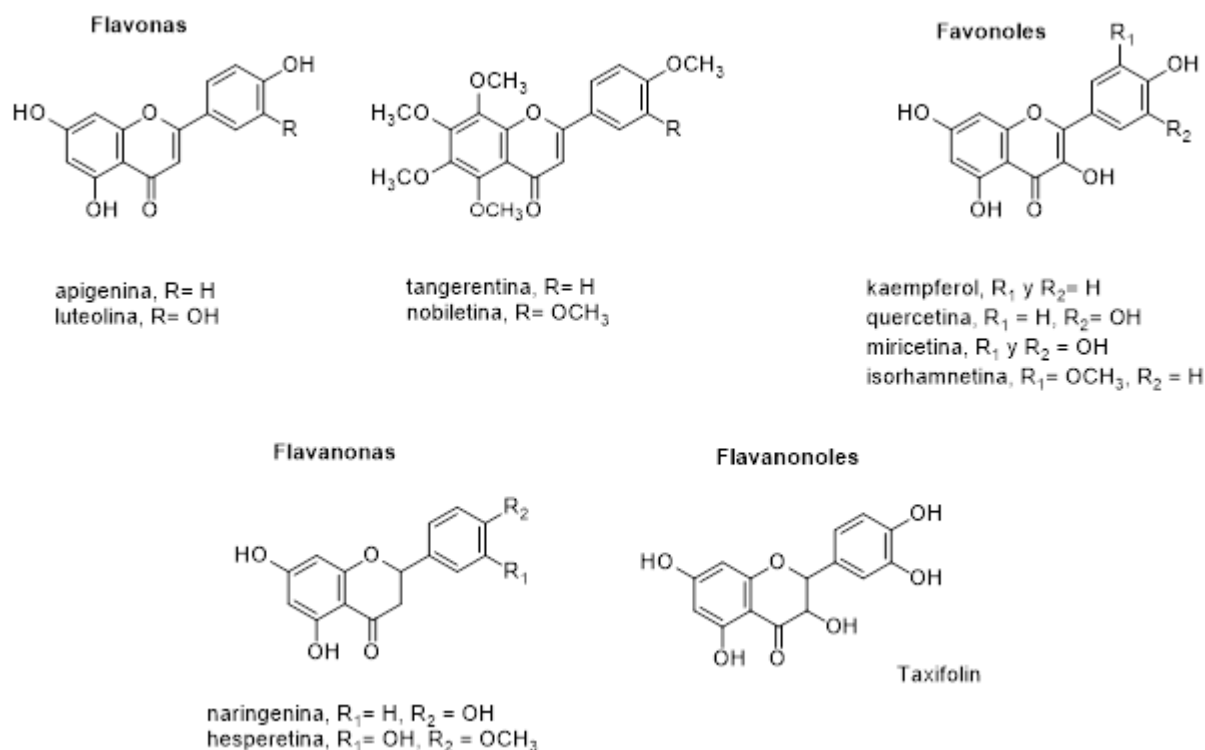


Figura 3. Estructuras de algunos compuestos pertenecientes a la familia de las flavonas, flavanonas, flavanonoles y flavonoles.

Los flavonoles presentan estructuras derivadas de tres esqueletos básicos: flavan-3-ol, flavan-4-ol y flavan-3,4-diol, con diversos sustituyentes en el anillo B (Maestro & Borja, 1993). Son importantes constituyentes de frutas en sus formas oligoméricas y poliméricas como las procianidinas, también conocidas como taninos condensados (Figura 4). Pueden además presentar residuos acilo, siendo el ácido gálico el sustituyente más frecuente. Los monómeros de flavan-3-ol son genéricamente conocidos como catequinas y se diferencian entre sí según el grado de sustitución del anillo B, así como también de la estereoquímica presente en el carbono 3 (Figura 4) (Rivas & García, 2002; Robards *et al.*, 1999; Tsao, 2010).

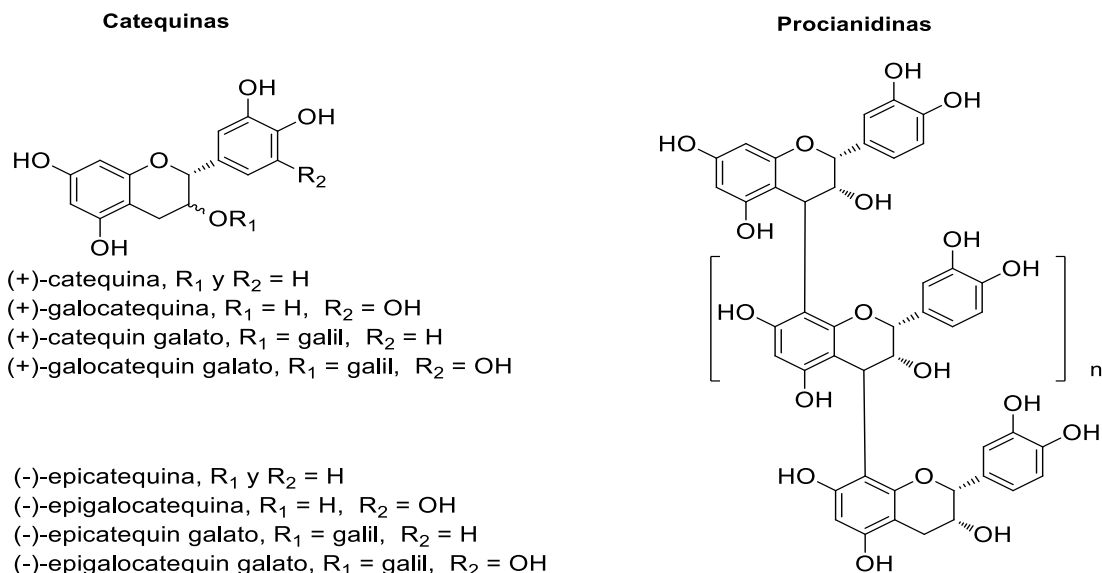
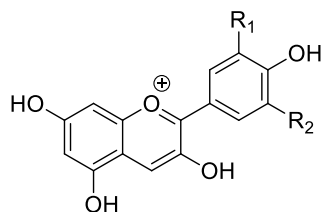


Figura 4. Estructuras de algunos flavanoles.

Las antocianinas son el segundo grupo más abundante de los flavonoides. Son responsables de dar las coloraciones rojas, violetas y azuladas ([Martínez et al., 2002](#)). Las más comunes son las cianidina, delphinidina, peronidina, pelargonidina, petunidina y malvidina (Figura 5). Es posible que se encuentren enlazadas con azúcares en la posición 3 con glucosa, arabinosa, y galactosa, así como restos de ácido cumárico, caféico, ferúlico o malónico, enlazados a la posición 6 del azúcar ([Robards et al., 1999](#); [Tsao, 2010](#)). Son solubles en agua, etanol y metanol, e insolubles en disolventes lipídicos. En medio ácido se encuentran en forma de cationes que se estabilizan por deslocalización de electrones en sus anillos. Poseen una alta reactividad en diferentes condiciones de pH, temperatura, presencia de oxígeno, dióxido de azufre, metales, entre otros, por lo que no son muy estables y es posible que se modifiquen sus propiedades químicas, físicas y biológicas ([Rivas & García, 2002](#)). Estos compuestos son parte importante de la pigmentación de los vegetales y frutas, es posible encontrarlos en bayas como arándanos, cerezas, ciruelas, fresas, en hortalizas como cebolla y rábano, así como en verduras como repollo y remolacha ([Cheynier, 2005](#)).



cianidina, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$
 delphinidina, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$
 pelargonidina, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$
 malvidina, $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$
 peonidina, $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$
 petunidina, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$

Figura 5. Estructuras de algunas antocianinas.

Estilbenos

Son compuestos que poseen dos subestructuras fenólicas conectados por un puente de metileno. Actúan como antifúngicos y fitoalexinas en las plantas y son sintetizados por las mismas en respuesta a infecciones o por daños estructurales. El resveratrol (Figura 6) es el estilbeno más conocido y estudiado, está presente mayoritariamente en la cáscara de las uvas. Ha mostrado cierta actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antifúngica y antimicrobiana (Kondratyuk & Pezzuto, 2004; Maestro & Borja, 1993).

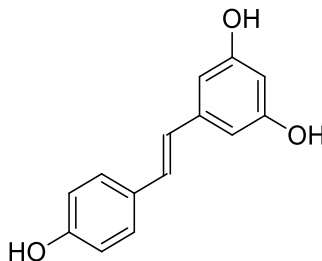


Figura 6. Estructura del resveratrol.

Lignanos

Son compuestos difenólicos que contienen 2,3-dibenzilbutano, los cuales son formados por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico y son ampliamente distribuidos en la naturaleza. El secoisolariciresinol es considerado un fitoestrógeno, cuando éste es ingerido por el ser humano las bacterias del intestino lo convierten en otros dos lignanos, enterolactona y el enterodiol, los cuales poseen un efecto estrógeno. Entre los estudios realizados se ha observado que es posible utilizar

este tipo de compuestos en terapias contra el cáncer, así como antioxidantes ([Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#); [Manach *et al.*, 2004](#)).

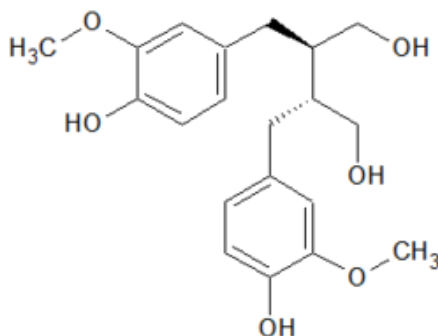


Figura 7. Estructura del secoisolariciresinol.

3.1.2 Métodos de determinación de polifenoles en matrices de alimentos

Para conocer el contenido y perfil de polifenoles presentes en alimentos (frutos, pulpas, jugos, jaleas, cereales, entre otros) es importante realizar una extracción de estos compuestos; para ello primero se escoge un disolvente adecuado que, en la mayoría de los casos, es una mezcla acuosa neutra de metanol, etanol o acetona, o mezclas ácidas de estos mismos solventes, dependiendo de las necesidades de los análisis posteriores y de la clase de polifenoles que se encuentren en la matriz. Luego, es importante considerar la temperatura de extracción, la cual puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (25 °C) o a una temperatura no superior a los 40 °C, para evitar descomposición. Se emplean técnicas de extracciones múltiples, usando agitador orbital o bien un baño ultrasónico, que permita un buen contacto entre el material y el disolvente. Posteriormente, se realiza un proceso de filtración y se obtiene el extracto adecuado para los análisis correspondientes ([Ameer *et al.*, 2017](#); [Ajila *et al.*, 2011](#)).

Para determinar de manera cualitativa la presencia de polifenoles en una matriz o bien su cuantificación e identificación, se puede utilizar metodologías de análisis que involucran reacciones específicas, según los grupos funcionales presentes en los polifenoles; por ejemplo, reacciones de reducción-oxidación (REDOX), precipitación de las proteínas y absorción de luz, entre otras.

Valiéndose de que los compuestos fenólicos pueden ser partícipes de reacciones REDOX, existen los métodos conocidos como Folin-Ciocalteu y Price-Butler. En el primero, el ion fenolato es

oxidado (en medio alcalino) mientras que el reactivo fosfotúngstico-molíbdeno es reducido; en el segundo método, también el ion fenolato es oxidado mientras que el ion Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} . En ambos métodos se genera un complejo azul que puede ser medido por espectroscopia UV-VIS y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o ácido tánico, dependiendo del compuesto con el cual se estandarice la medición ([Singleton *et al.*, 1999](#); [Price *et al.*, 1977](#)).

Para la determinación de los taninos se puede utilizar el método de Price-Butler, en el cual se utiliza la propiedad que poseen estos compuestos para precipitar proteínas. Este método se lleva a cabo en tres pasos: primero se determina la cantidad de fenoles totales, luego se remueven los taninos mediante precipitación con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) y finalmente se determina en una alícuota del sobrenadante la concentración de fenoles. Se cuantifica los taninos como la diferencia entre los fenoles totales de la primera etapa y los que quedan en el sobrenadante; el contenido de taninos totales se expresa como equivalentes de ácido tánico o equivalentes de ácido gálico ([Waterman & Mole, 1994](#)).

Para la cuantificación de flavan-3-ol se utiliza una solución metanólica de vainillina acidificada. El principio de este método es la reacción entre el aldehído aromático de la vainillina con el anillo A de los flavan-3-ol, lo que genera un aducto de color rojo y los resultados se expresan como equivalentes de catequina ([Hagerman, 2002](#)).

En el caso de los flavonoides totales, los métodos existentes se basan en la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos y el grupo ceto de los flavonoides con el tricloruro de aluminio o el 2-aminoetil difenilborato ([Ho *et al.*, 2012](#)).

Todos los métodos anteriores son utilizados para conocer la cantidad de compuestos polifenólicos totales que hay presentes en la matriz. Pero, si lo que se requiere es conocer el perfil de compuestos, identificar cuáles son los mayoritarios y cuáles se ven afectados puntualmente según el tipo de procesamiento que se le aplique a la matriz, se cuenta con técnicas un poco más selectivas y específicas, como lo es HPLC o UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*). Dichas técnicas pueden utilizar detectores ultravioleta-visible (UV-VIS), en los cuales a una longitud de onda definida es posible observar una señal emitida por cada compuesto según su absorción de luz. Por ejemplo las antocianinas poseen una banda característica entre 510-520 nm que las diferencia de los otros compuestos fenólicos cuyas absorciones normalmente están en 260-280 nm. Con este tipo de detectores es necesario, para identificar y cuantificar cada compuesto, utilizar estándares

comerciales de polifenoles; el problema es el costo monetario que implica tener cada uno de ellos y además no existen estándares de todos los tipos de compuestos que se pueden elucidar. Es por ello que en los últimos años se han desarrollado nuevas metodologías (Cuadro 1) utilizando detectores más versátiles, como los detectores de masas, con los cuales se logra obtener a un tiempo de retención información específica como la masa del ion molecular, así como iones generados del fraccionamiento del compuesto. Con esta información se puede obtener la identidad tentativa de un compuesto utilizando una base de datos y, de ser necesario, se puede comparar con estándares comerciales para asegurar su identidad.

Cuadro 1. Condiciones de análisis por cromatografía líquida para la determinación de compuestos polifenólicos en diferentes matrices de alimentos.

Matrices	Analitos a identificar	Método de extracción	Parámetros cromatográficos, equipo y columna	Referencia
Bayas	Antocianinas, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles	H ₂ O, ultrafiltración de membrana	LC preparativa: 250 × 20 mm Eurospher 100–5 C ₁₈ Identificación: HPLC/DAD/ESI [±] -MS ⁿ , 150 × 2,1 mm, 5 µm. λ 280, 325, 360 y 520 nm	Kowalska <i>et al.</i> , 2017
Cas (<i>P. friedrichsthalium</i>)	Ácido elágico, miricetina, quercitrina, quercetina	MeOH/H ₂ O (70 mL/100 mL), pulpa deshidratada, dispersión mecánica	LC-TOF-ESI [±] (m/z 100–1000), Synergi Hydro RP 80A 250 × 4,6 mm, 4 µm	Flores <i>et al.</i> , 2013
Güisaro (<i>P. guinnesis</i>), jambolan, nance, lúcuma	Taninos hidrolizables y condensados, flavonoles, flavanoles	Acetona/H ₂ O/HCOOH (70:29:1). Pulpa seca, extracción acelerada con solventes	HPLC-DAD-ESI [±] -MS ⁿ , Aqua RP18 150 × 2,0 mm, 3 µm.	Gordon <i>et al.</i> , 2011
<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton	Ácido rosmarínico, scutellarein-7-O-glucuronido, ácido caféico, apigenin-7-O-diglucuronido, apigenin-7-O-glucuronido	Etanol (EtOH)/H ₂ O (75 mL/100 mL), extracción acelerada con solventes (N ₂ 1200 psi 70 °C)	UPLC-PDA-ESI [±] -TOF-MS, Kintex XB C ₁₈ column 150 × 2,1 mm, 1,7 µm	Assefa <i>et al.</i> , 2018
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Hexósidos de ácido caféico, ácido homovanílico y ácido dicafeoilquinico	Metanol (MeOH)/H ₂ O (80 mL/100 mL)	HPLC-DAD-ESI [±] -MS/MS, Zorbax 300SB-C ₁₈ column (2,1 × 150 mm; 5 µm)	Anton <i>et al.</i> , 2017
<i>Rubus fruticosus</i>, <i>Prunus spinos</i>, <i>Cornus mas</i>	ácido gálico, rutina	HCOOH/MeOH/H ₂ O (0.1/70/29.9)	LC-FLD λ _{ex} 280, 320, 322 nm λ _{em} 360 nm. Eclipse XDB C ₁₈ 150 × 4,6 mm	Radovanović <i>et al.</i> , 2013
Diversos té (verde, herbales y frutales)	Ácido gálico, ácido cafeico (+)-catequina, (–)-epicatequina, (–)-epigallocatequina, procianidina B ₁ , procianidina B ₂	95 °C 10 min	LC-PDA/FLD scan 260–400 nm Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ , 150 × 4,6 mm, 5 µm	Veljković <i>et al.</i> , 2013
Frutas secas y enlatadas	Ácido vanílico, elágico, gálico, p-cumárico, clorogénico, caféico, ferúlico, rosmarínico, miricetina, quercetina, kaempferol, delphinidina, cianidina, pelargonidina	MeOH/H ₂ O (62.5 mL/100 mL), sonicación	HPLC-DAD at 260, 280, 329, y 520 nm. Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ column 150 × 4,6 mm, 3,5 µm	Miletić <i>et al.</i> , 2014

continuación del cuadro 1

Guayaba rosada	Elagitaninos, flavones, flavonoles, flavanoles, proantocianidinas, dihidrochalconas, antocianidinas, estilbenos, acetofenonas, benzofenonas	Pulpa liofilizada, MeOH/H ₂ O (90:10), sonicación	UHPLC-DAD-ESI ⁺ -MS/MS, BHE Shield RP18 150 × 2,1 mm, 1.7 μm	Rojas-Garbanzo <i>et al.</i> , 2017
Jugo de mora	Elagitaninos antocianinas	Jugo microfiltrado	HPLC-DAD-ESI ⁺ -IT-MS/MS Lichrosrb ODS-2 250 × 4,6 mm, 5 μm	Azofeifa <i>et al.</i> , 2018

3.2 Importancia biológica de los polifenoles

Existe una gran variedad de estudios sobre los efectos preventivos atribuidos a la ingesta de productos con alto contenido de polifenoles, ya que, desde el punto de vista de su actividad biológica muchos, de estos compuestos poseen la capacidad de captar radicales libres, lo que contribuye a disminuir el estrés oxidativo, que por diferentes factores pueden sufrir el metabolismo humano y el de las plantas.

La ingesta diaria de frutas, verduras y granos enteros (que son ricos en polifenoles) genera una disminución en el riesgo de sufrir ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica, así como enfermedades degenerativas, las cuales están relacionadas con el aumento del estrés oxidativo en las células (Tsao, 2010; Barberán, 2003). Por otro lado, existen también compuestos que exhiben actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas (Rivas & García, 2002).

Por dichos mecanismos de acción se ha generado una gran cantidad de investigaciones sobre los beneficios que los polifenoles ejercen en el ser humano. En la Figura 8 se resumen algunas de las actividades y efectos biológicos que se le ha atribuido a la ingesta de alimentos con un contenido importante de compuestos polifenólicos.



Figura 8. Efectos y actividades biológicas asociadas a los polifenoles.

3.2.1 Actividad frente al cáncer

El proceso de carcinogénesis lleva alrededor de unos 10 años o más en desarrollarse; se ha caracterizado por poseer una variedad de etapas y ser microevolucionario. Generalmente la aparición de un tumor se deriva de la aparición de una célula anormal y a partir de la misma se desarrollan cuatro etapas: 1- la iniciación, en la cual se genera un daño a nivel del ADN; 2- luego le sigue la etapa de promoción, en la cual se ve involucrada la expansión de las células dañadas; este proceso es parcialmente reversible; 3- la formación de la masa tumoral es conocida como progresión, en la cual se da una pérdida del control del crecimiento celular por una alteración del sistema defensivo, y 4- la última etapa conocida como metástasis o invasión ([Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#)).

Entre los posibles iniciadores del cáncer se encuentran las radiaciones o ciertos químicos que inducen la generación de radicales libres, los cuales dañan el ADN. Sumado a esto existen células del sistema inmune como neutrófilos y macrófagos que producen especies reactivas de oxígeno, a las cuales se les atribuye un efecto directo sobre las proteínas que reparan el ADN; si este último no es reparado, se pueden dar alteraciones que conllevan a mutaciones que al final derivan en un cáncer ([Kondratyuk & Pezzuto, 2004](#); [Álvarez & Orallo, 2012](#)).

Los efectos anticancerígenos de los polifenoles se han observado en tipos de cáncer de boca, el estómago, el duodeno, el colon, el hígado, el pulmón, la glándula mamaria o la piel. Se han probado muchos polifenoles, como proantocianidinas, flavonoides, resveratrol, taninos, epigallocatequina-3-galato, ácido gálico y antocianinas; todos mostraron efectos protectores en

algunos modelos, aunque se encontró que sus mecanismos de acción eran diferentes ([Johnson et al., 1994](#)), como se puede observar en la Figura 9.

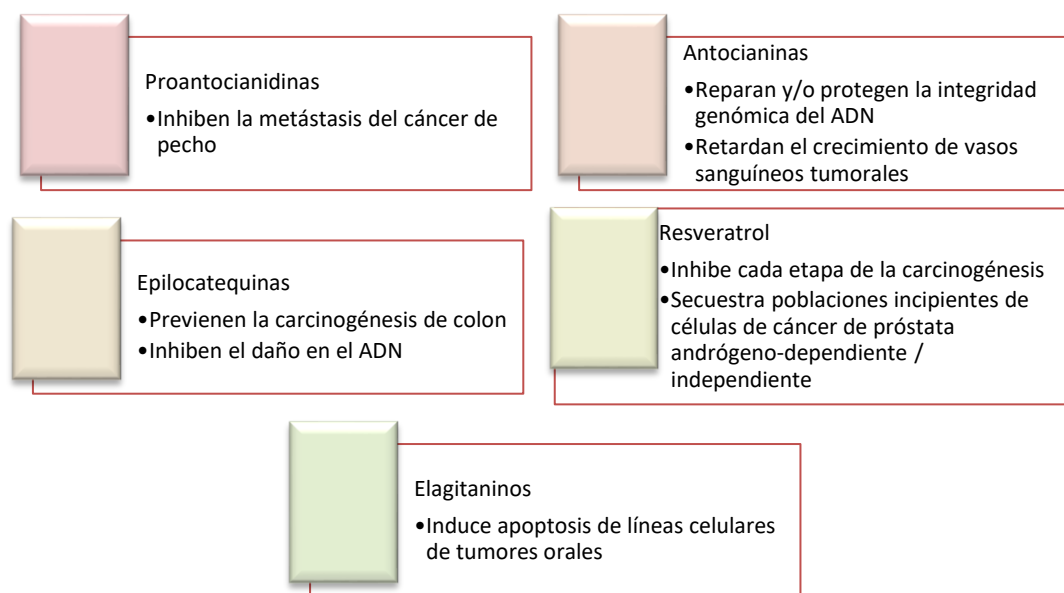


Figura 9. Actividad frente al cáncer de algunos tipos de polifenoles.

Los flavonoides pueden ser considerados inhibidores tumorales que tienen la capacidad de interferir en cualquier etapa del proceso mediante diversos mecanismos ([Álvarez & Orallo, 2012](#); [Wang et al., 2011](#)). Pueden dificultar la absorción del promotor tumoral en el tubo digestivo, sin embargo, muchos de los efectos anticancerígenos podrían ser el resultado de la modulación de las enzimas de la fase I del metabolismo tales como el citocromo P450 (Fase I) o podrían generar una inducción de enzimas antioxidantes y destoxificadoras, lo que provocaría una inactivación de agentes carcinogénicos ([Muñoz & Ramos, 2007](#); [Álvarez & Orallo, 2012](#)).

Algunos otros mecanismos por los cuales los polifenoles tienen una importancia a nivel de tratamiento contra el cáncer es que interfieren en la metabolización de agentes mutagénicos o de sus precursores, interfiriendo en la actividad de las enzimas de la fase II del metabolismo ([Álvarez & Orallo, 2012](#); [Wang et al., 2011](#)).

El resveratrol podría inhibir cada etapa de la carcinogénesis, eliminar poblaciones incipientes de células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos a través del antagonismo del receptor de andrógenos y eliminar poblaciones incipientes de células de cáncer de próstata andrógeno-independientes al cortocircuitar los bucles autocrinos dependientes del factor de crecimiento epidérmico en las células cancerosas ([Stewart et al., 2003](#)).

Entre los flavonoides que poseen la capacidad de desintoxicación se encuentran la crisina, baicaleína y la naringenina, las cuales inhiben la actividad de las aromatasas y disminuyen la biosíntesis de estrógeno, produciendo un efecto antiestrogénico, importante en el cáncer de próstata y mama. La genisteína, perteneciente a la familia de las isoflavonas, ha demostrado ser un inhibidor específico de la proteína cinasa de tirosina e inhibe además, la inducción estimulada por el factor de necrosis tumoral de las moléculas de adhesión celular derivada del endotelio vascular (Muñoz & Ramos, 2007, Álvarez & Orallo, 2012).

3.2.2 Actividad cardioprotectora

Las flavonas e isoflavonas ejercen un efecto vasodilatador dependiente de la estructura del compuesto. Existe una variedad de mecanismos por los cuales pueden ejercer dicho efecto; uno de ellos se encuentra asociado a la inhibición de fosfocreatincinasa o a alguno de los procesos activados por ésta, aunque la inhibición de las cinasas de las fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y el bloqueo de la entrada de calcio pueden contribuir a este efecto (Muñoz & Ramos, 2007).

Los compuestos como el resveratrol, la quercetina, las catequinas y proantocianidinas inhiben la oxidación de lipoproteínas y el bloqueo directo a nivel celular de la toxicidad de la LDL oxidasa. Además inhiben la agregación plaquetaria por inhibición de la ciclooxigenasa (COX) o de la lipooxigenasa (LOX) o por impedimento en la formación de tromboxanos. Otros incrementan las concentraciones celulares del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC).

Los efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares se deben a la disminución de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el aumento en la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL), la reducción de la liberación de mediadores a partir de mastocitos y la disminución de la inflamación vascular y la inhibición de la agregación plaquetaria y los daños vasculares de la formación de trombos y vasodilatación (Muñoz & Ramos, 2007; Barberán, 2003; Manach *et al.*, 2005).

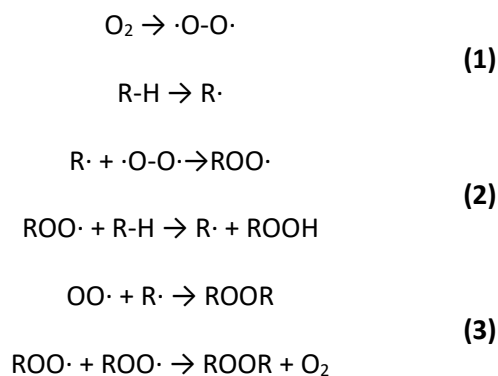
La lipoperoxidación de las membranas celulares puede llevar a un aumento en la degeneración de la sinapsis, así como de algunas neuronas que pueden llevar a desórdenes neuronales tales como Alzheimer, Parkinson y Huntington (Kondratyuk & Pezzuto, 2004; Barberán, 2003). Diferentes estudios han demostrado que la ingesta de bayas, como las moras (*Rubus*), atenúan los procesos degenerativos del cerebro en roedores, ya que los metabolitos obtenidos

después de la ingesta de esta fruta, presentaron un efecto neuroprotector contra el ataque de radicales H_2O_2 (Tavares *et al.*, 2012).

3.2.3 Actividad antioxidante

La oxidación se puede definir como el proceso por el cual un compuesto pierde electrones y sufre cambios estructurales, ya sea por ganancia de oxígenos o pérdida de hidrógenos. La reducción es el proceso contrario, se da por una ganancia de electrones y se ganan hidrógenos o se pierde oxígeno en su estructura. Dichos procesos se llevan a cabo en nuestro organismo. Las estructuras de las macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos poseen pares de electrones libres que están disponibles para realizar reacciones REDOX y formar compuestos o aductos que en algunos casos pueden ser perjudiciales para el metabolismo celular (Quintanar & Calderón, 2009).

El oxígeno es uno de los elementos necesarios para muchos procesos biológicos en la mayoría de los organismos vivos, pero también es el principal agente de deterioro de numerosos alimentos y materiales orgánicos que se encuentran expuestos al aire. De la misma forma, la luz es esencial para las plantas en la fijación de carbono por medio de los pigmentos fotosintéticos, pero está compuesta por longitudes de onda pequeñas (UV) que son perjudiciales a nivel celular. Estos dos factores son considerados iniciadores de reacciones radicalarias a nivel celular, las cuales constan de tres etapas: iniciación (1), propagación (2) y terminación (3) (Maestro & Borja, 1993).



En la fase inicial se da la formación de radicales libres orgánicos $R\cdot$, también conocida como autooxidación. En la fase de propagación se forman radicales peróxidos $ROO\cdot$ que posteriormente reaccionan con compuestos orgánicos generando más especies $R\cdot$, las cuales continúan la reacción con oxígeno molecular. Finalmente, cuando todo el oxígeno o los compuestos orgánicos han

reaccionado, empieza la fase de terminación. En ésta, los radicales se combinan entre sí para dar productos inactivos (Maestro & Borja, 1993).

En nuestro organismo se generan una gran cantidad de especies radicalarias muy reactivas como es el caso del O_2^- , O_2^{\bullet} , $\cdot OH$, $\cdot OR$, $NO\cdot$, que se clasifican tanto como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés), las cuales producen daños a los carbohidratos, al ADN, a las proteínas y a los lípidos (Quintanar & Calderón, 2009; Muñoz & Ramos, 2007).

Los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por estos radicales se conocen como agentes antioxidantes, los cuales son específicos, afines, numerosos y diversos, y se pueden clasificar según se detalla en la Figura 10 (Rivas & García, 2002).



Figura 10. Clasificación de los antioxidantes según su actividad.

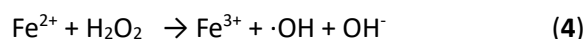
Los mecanismos antioxidantes que se llevan a cabo en el organismo para controlar el estrés oxidativo son diversos (Quintanar & Calderón 2009; Robards *et al.*, 1999). Existen agentes endógenos tales como:

- Proteínas que se acomplejan a las especies reactivas y evitan su acción, tales como transferrina y ceruloplasmina, que acumulan o transportan metales, así como la hemoglobina y la mioglobina que transportan oxígeno.
- Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva, tales como la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la disminución de O_2 a H_2O_2 , la glutatión peroxidasa (GPx) que cataliza la reducción

del peróxido de hidrógeno o lipoperóxidos, la glutatión sulfhidril transferasa (GST) y la catalasa (CAT).

- Co-sustratos antioxidantes, los cuales son empleados por enzimas para reducir parcialmente a los radicales como lo es el glutatión y el NADPH.
- Enzimas que regeneran sustratos o co-sustratos antioxidantes como la vitamina E, el NADPH y el glutatión reductor.

Los antioxidantes exógenos son aquellos que provienen de la dieta, como es el caso de los compuestos polifenólicos, los cuales son considerados fuertes antioxidantes, ya que debido a su estructura, pueden “neutralizar” los radicales libres donando un electrón o un átomo de hidrógeno. Poseen además un sistema altamente conjugado y ciertos patrones de hidroxilación que hacen posible suprimir la generación de radicales libres y por ende reducir la velocidad de oxidación de compuestos importantes a nivel celular. Además, su estructura les permite atrapar metales de transición, como Fe^{2+} , lo que conlleva a una disminución de la reacción de Fenton (4), evitando así la oxidación causada por los radicales hidroxilo altamente reactivos (Quintanar & Calderón, 2009).



Los flavonoides constituyen la familia de polifenoles a la cual se les ha adjudicado la mayor parte de la actividad antioxidante de ciertos alimentos, principalmente en frutos y vegetales. Poseen la cualidad de catalizar el transporte de electrones, así como de unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN (Martínez *et al.*, 2002), esto por la presencia de ciertas características estructurales (Rivas & García, 2002; Robards *et al.*, 1999), tales como:

- Poseer grupos funcionales capaces de donar electrones e hidrógeno con potenciales de reducción apropiados (540-700 mV).
- Presencia de un sistema altamente conjugado debido a los anillos aromáticos, por lo que es posible deslocalizar el radical formado.
- Grupos hidroxilo y sus pares de electrones libres son considerados agentes quelatantes de metales de transición tales como Fe o Zn.
- Algunos por su carácter lipofílico o hidrofílico, así como por su coeficiente de reparto, poseen una buena accesibilidad al lugar de acción.

Dichos compuestos retiran el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, de manera que se bloquea su acción sobre las células. Las procianidinas pueden ser absorbidas por las membranas celulares y protegerlas de la acción de estos radicales libres; esto debido a que poseen la ventaja de tener una naturaleza tanto lipofílica como hidrofílica, por lo que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger las células cerebrales, las cuales son muy sensibles al ataque de los radicales libres (Martínez *et al.*, 2002). La quercitina es otro de los flavonoides que posee un efecto inhibitorio en la producción de radicales por parte de las células. Es un potente inhibidor de la producción de neutrófilos y O_2^- , inhibe la fosforilación de proteínas neutrofílicas, así como suprime la peroxidación lipídica en muchos sistemas biológicos como mitocondrias, cloroplastos, eritrocitos y micromosomas (Robards *et al.*, 1999).

Diferentes estudios epidemiológicos hacen referencia a la importancia del consumo de antioxidantes para obtener beneficios en la salud. Dichos compuestos pueden ser compuestos polifenólicos, como flavonoides, que pueden encontrarse en frutas y hortalizas a las cuales se les ha analizado su capacidad antioxidante y se les ha atribuido la disminución de síntomas provenientes de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, o inclusive, tener alguna incidencia sobre el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Dembitsky *et al.*, 2011; Collins 2005).

Wang *et al.* (1996) determinaron la actividad antioxidante de un total de 12 frutas y jugos de frutas comerciales, por medio del ensayo ORAC. En base seca, entre los frutos analizados la fresa tenía otra vez la actividad más alta, seguida por la ciruela, naranja, pomelo rosa, tomate, kiwi, uva roja, uva blanca, manzana, melón, pera y plátano. Se observó que la mayor parte de la capacidad antioxidante de estos frutos se encuentra en las fracciones de jugo. Además, se obtuvo que el jugo de uva posee la mayor actividad, seguido por el jugo de toronja, jugo de tomate, jugo de naranja y jugo de manzana.

Posteriormente, Wang y colaboradores (1997) demostraron que las antocianinas presentan actividades antioxidantes altas; es por ello que al estar presentes en mayor proporción en frutas como fresas, arándanos y uvas, éstas poseen altos valores en su actividad antioxidante.

Además de las antocianinas, aquellos alimentos que son ricos en flavanonas, como la naranja y en flavonoles como la cebolla, el puerro, las espinacas y la col verde, presentan actividades antioxidantes elevadas ([Proteggente et al., 2002](#)).

Vinson *et al.* en el 2001 realizaron un estudio sobre la cantidad de fenoles libres y ligados en 20 frutos que se consumen en la región de América, determinados por medio del método CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*), con el cual se observó que, en base seca, el arándano tenía los niveles más altos de fenoles totales seguido de la uva roja. Se observó que la vitamina C representaba una pequeña contribución a los antioxidantes en las frutas, con la excepción de melón, nectarina, naranja, uva blanca y fresa.

En lo que respecta a frutas tropicales, Wu *et al.* en el 2004 empezaron a desarrollar una base de datos con las capacidades antioxidantes de componentes tanto lipofílicos como hidrofílicos en una serie de frutas como banano, piña, fresa, melón, kiwi y sandía, entre otros. A este trabajo se le unen otra gran variedad de investigaciones que evalúan dicha capacidad antioxidante, tanto con el método ORAC, como ABTS, TEAC, DPPH, además de la determinación de polifenoles totales y de ácido ascórbico ([Patthamakanokporn et al., 2008](#); [Almeida et al. 2011](#); [Mahattanatawee et al. 2006](#)). Esto con el fin de conocer y ampliar la gama de alimentos que pueden ser funcionales y que aporten beneficios a la salud del ser humano.

En Costa Rica también se ha impulsado la investigación de la actividad antioxidante de algunas frutas tropicales no tradicionales; tal es el caso de la pitahaya que, según un estudio presentó un bajo contenido de vitamina C (116-171 $\mu\text{g/g}$) en su pulpa, pero es una fruta rica en betacianinas (0,32-0,41 mg/g) y compuestos polifenólicos (5,6-6,8 μmol ácido gálico/ g), así como una alta actividad antioxidante según su valor de ORAC (8,8-11,3 μmol equivalentes de Trolox/ g) ([Vaillant et al., 2005](#)). Otro fruto no tradicional es la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), la cual presentó un valor de H-ORAC de 17 ± 1 μmol equivalentes de Trolox / g , el contenido de polifenoles totales fue 48 ± 3 mg equivalentes de ácido gálico /100 g y el contenido de ácido ascórbico fue $12,5 \pm 0,1$ $\text{mg}/100$ g ([Acosta et al., 2009](#)). En el 2012 se realizó un estudio de la capacidad antioxidante determinada por H-ORAC y su correlación con la capacidad antioxidante a nivel celular empleando eritrocitos ERYCA, reportándose que las bayas tropicales como arándano y mora presentan valores más altos en ambas metodologías y a pesar que su mecanismo de determinación es diferente, se puede

establecer una buena correlación entre los valores determinados por los métodos ERYCA y ORAC (González *et al.*, 2012).

3.3 Efecto del procesamiento en los compuestos polifenólicos

Existe una gran cantidad de estudios que se enfocan en el impacto que ejerce el procesamiento de un alimento, en especial de las frutas, sobre su funcionalidad nutricional y cómo ésta puede llegar a incrementarse o, en la mayoría de los casos disminuirse, ya sea por fenómenos de degradación térmica, enzimática, oxidativa o polimerización, entre otros (Kalt, 2005).

Gancel y colaboradores (2012) evaluaron el impacto de procesos industriales, tales como el escaldado y almacenamiento a diferentes temperaturas, sobre los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante del jugo y pulpa de *Rubus adenotrichos*. Ellos encontraron que evidentemente los procesos térmicos ejercen una reducción de los compuestos fenólicos y del color del producto, así como una disminución de las antocianinas y degradación de los elagitaninos. Además, observaron que durante todo el procesamiento de la fruta, las antocianinas cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-manolilglucósido se redujeron en 52 % y 64 % respectivamente, mientras que los elagitaninos disminuyeron por degradación a ácido elágico en un 80%. En lo que respecta a la capacidad antioxidante (H-ORAC), se observó una disminución de casi un 47 %. Durante el almacenamiento a diferentes temperaturas se reportó una disminución de las antocianinas y los elagitaninos después de 35 días, reducción que se ve aumentada a temperaturas altas (45 °C).

Gil-Izquierdo y colaboradores (2002) evaluaron la cantidad de compuestos fenólicos, vitamina C y la capacidad antioxidante de jugos de naranja tratados con cinco procesos industriales, tales como prensado del fruto, diferentes niveles de pasteurización, concentración, y almacenamiento en congelación. Además, compararon el prensado manual con el industrial. Observaron que el prensado industrial extrae 22 % más de compuestos polifenólicos que el prensado manual. También se encontró un descenso en la cantidad de compuestos fenólicos durante el almacenamiento en congelación, mientras que el uso de concentración causa una pequeña precipitación de dichos compuestos (formación de turbidez). La pasteurización de la pulpa causa una degradación de algunos compuestos como el ácido cafeico y sus derivados, así como de vicenina y

narirutina de un 28-35 %. En lo que corresponde a la vitamina C, la extracción de jugo a nivel industrial presenta un 25 % más que el jugo extraído por medio de la técnica doméstica.

De acuerdo con Alper *et al.* (2005), se ha observado que en tratamientos de clarificación el uso de coadyuvantes de filtración (polivinilpolipirrolidona, gelatina, bentonita y Kiselguhr) causa una mayor reducción en el contenido de polifenoles totales (21-32 %) con respecto al empleo de ultrafiltración (6,1 %). Por otro lado, estos autores observaron que un tratamiento térmico como la pasteurización junto a la clarificación también causa una disminución en el contenido de polifenoles totales.

Los efectos del cultivo, tiempo de cosecha, pelado y almacenamiento también fueron evaluados en frutos como las manzanas y peras. Se observó que en condiciones de almacenamiento y frío prolongado (1 °C por 9 meses), la cantidad de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y el contenido de vitamina C se ven disminuidos en aproximadamente un 35 %, 75 % y 80 %, respectivamente. Esto podría deberse a la generación de estrés oxidativo durante el almacenamiento, especialmente bajo atmósferas controladas, ya que éstas inducen cambios metabólicos significativos como el aumento en la actividad de la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa. El pelado de dichas frutas disminuye en un 26 % el contenido de polifenoles totales, en un 48 % la concentración de vitamina C y en un 18 % la capacidad antioxidante, esto como resultado de que la mayoría de los compuestos antioxidantes se encuentra en la cáscara (Kevers *et al.*, 2011).

Según un estudio de Mullen y colaboradores (2002), las frambuesas rojas que crecen en Escocia son una fuente importante de vitamina C y compuestos fenólicos, sobre todo de antocianinas y elagitaninos. Este grupo de investigadores observó que la congelación no afecta la capacidad antioxidante de la fruta fresca, ni los niveles de vitamina C o de compuestos fenólicos. Un resultado similar se observó en frambuesas que se cultivan en España, la congelación del fruto por un corto tiempo afectó levemente los valores de ácido elágico extraído, el contenido total de polifenoles y la vitamina C. mientras que un almacenamiento en congelación a largo plazo (12 meses), no se observó ningún cambio significativo en el contenido de polifenoles totales, pero sí una disminución significativa en ácido elágico de 14-21 % y en vitamina C de 33-55 % (Begoña de Ancos *et al.*, 2000).

En el caso de los tratamientos enzimáticos, estos tienen como propósito aumentar la cantidad de jugo extraído de una fruta; en el caso de bayas como la aronia (*chokeberry*), se observó

que existe un aumento de un 63-75 % en la extracción de jugo si se aplica una maceración enzimática de la pulpa junto con un tratamiento térmico. La maceración enzimática permitió, en estas bayas, un aumento en su capacidad antioxidante, el contenido de antocianinas y el contenido de polifenoles totales (Borowska *et al.*, 2009). Se ha observado también que el uso de enzimas proteolíticas en el tratamiento de una pulpa de manzana para la obtención de jugo mejora el contenido de polifenoles, especialmente procianidinas, ya que éstas se ven aumentadas luego del tratamiento; en lo que respecta a la actividad antioxidante, se observa un ligero aumento de la misma luego de que la pulpa es tratada enzimáticamente (Oszmianski *et al.*, 2009).

Las zarzamoras son una fuente rica en polifenoles, en particular de antocianinas, y, como la mayoría de las bayas, se consumen luego de ser congeladas o procesadas térmicamente después de un almacenamiento a largo plazo. Hager y sus colaboradores (2008 y 2010) evaluaron los efectos del procesamiento y de un período de 6 meses de almacenamiento sobre las antocianinas y la capacidad antioxidante de zarzamoras que fueron ultracongeladas individualmente, enlatadas en agua y almíbar, procesadas en puré y jugo (prensado y clarificado). Estos autores observaron que el procesamiento dio lugar a aumentos en el color de hasta 7 %, pérdidas en antocianinas monoméricas de hasta un 65 %, así como pérdidas en la capacidad antioxidante. El almacenamiento a 25 ° C de todos los productos procesados causó pérdidas dramáticas en las antocianinas monoméricas (75 %), mientras que el almacenamiento prolongado bajo condiciones de congelación a -20 °C no causó cambios en la capacidad antioxidante (Hager *et al.*, 2008).

3.4 *Bactris guineensis*: el huiscoyol, un fruto no tradicional

Uno de los frutos no tradicionales que podría ser un foco de estudio en nuestro país es el huiscoyol. Su nombre científico es *Bactris guineensis*, pertenece a la familia *Arecaceae*, es conocido como huiscoyol, viscoyol, güiscoyol y uvita de monte. Se puede encontrar desde Nicaragua hasta el norte de Colombia y Venezuela.

Chízmar Fernández (2009) detalla que el tallo y las hojas laterales de la planta presentan una longitud de 50-60 cm de longitud, están cubiertas con espinas amarillentas delgadas con el ápice negro. La palma adulta puede alcanzar 2,0-3,5 m de altura y 2,6-3,0 cm de diámetro. La inflorescencia es un ramo de flores con una bráctea de color blanco cremoso (hoja modificada) cubierta con la espina dorsal en la parte superior que protege de los animales. Las flores son monoicas, lo que explica por qué las flores masculinas y femeninas se pueden observar en la misma planta.

Una planta puede producir varios tallos y de 10 a 15 racimos de fruta (equivalentes a 1,5 a 3,75 kg de fruta) en una temporada de cosecha. Considerando que la densidad puede llegar a 270-400 plantas / ha, la producción potencial puede llegar a 675 a 1000 kg / ha en una temporada de cosecha y 1 350 a 2 000 kg / ha / año.

Los frutos crecen en racimos (de 1 a 3 racimos por tallo) de diferentes tamaños con un peso que oscila entre 150-250 g (ver Figura 11). Los frutos poseen un tamaño 1,2-2,5 cm de largo, ovobados, de color púrpura rojizo a negro púrpura cuando están maduros, con una sola semilla, la cual se encuentra rodeada por una pulpa fibrosa de sabor ácido y una capa delgada de cáscara. Posee un diámetro alrededor de $(1,5 \pm 0,1)$ cm similar a la uva, lo que explica los nombres vernáculos "uvita" o "uvas pequeñas" que se le atribuyen en algunas partes de Centroamérica y Colombia (Henderson, 2000).

El peso de cada fruta es relativamente homogéneo, alrededor de $3,6 \pm 0,6$ g. A diferencia de la uva, solo hay una semilla que tiene forma redonda y representa el 34 % de la fruta. La parte comestible de la fruta, que incluye la pulpa y la piel fina representa el 66 % del peso total del fruto, que son las partes más importantes que se consumen en forma directa o como materia prima. Este valor relativamente alto hace que esta fruta pueda potencialmente adaptarse a un procesamiento a nivel industrial de jugos, mermeladas o producción de bebidas alcohólicas (Galeano & Bernal, 2010).



Fuente: http://www.palmpedia.net/wiki/Bactris_guineensis

Figura 11. Palmera, racimo y fruto de *Bactris guineensis*.

Algunos estudios atribuyen el color particular del huiscoyol a la presencia de compuestos polifenólicos pertenecientes a la familia de las antocianinas, las cuales de acuerdo con Osorio y colaboradores (2010), fueron aisladas e identificadas por cromatografía de contracorriente y HPLC; dichos investigadores señalaron la cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido como los

componentes principales (72,2 % y 15,7 %, respectivamente), además de otros pigmentos en pequeñas cantidades como la peonidina-3-rutinósido (5,1 %). Ese mismo grupo de investigación en el 2011 realizó un estudio por medio de espectroscopía paramagnética de resonancia (EPR) para analizar la actividad captadora de radicales libres mediante los métodos ABTS y DPPH (Osorio *et al.*, 2011). Estos investigadores observaron que un extracto rico en antocianinas provenientes del fruto presenta una mayor actividad barredora de radicales con el método DPPH ($1,61 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) que con el método ABTS ($2,02 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), además, el extracto rico en antocianinas posee una mayor actividad contra ambos radicales que las antocianinas individuales, por lo que es posible que exista un efecto de sinergia en el extracto.

En el 2017, Lopez y colaboradores estudiaron la acción citoprotectiva del huiscoyol, para lo que se obtuvieron extractos de pulpa y semilla del fruto de la palma y se evaluó su capacidad para proteger tanto las neuronas como los astrocitos (Lopez *et al.*, 2017). El análisis de estrés de la actividad química antioxidante mostró que el extracto crudo y los extractos en acetato de etilo y etanol tenían mayor capacidad antioxidante con los métodos ABTS y DPPH en comparación con los extractos obtenidos en hexano y diclorometano. Los ensayos de toxicidad también mostraron que el extracto crudo de pulpa y los extractos de acetato de etilo y etanol en dosis bajas no afectaron la viabilidad de las células de neuroblastoma y de astrocitos primarios. Por otro lado, los extractos de acetato de etilo y etanol no solo disminuyeron la producción de radicales de O_2 , sino que también presentaron un efecto neuroprotector contra el estrés oxidativo inducido por la rotenona.

A raíz de que existen hasta ahora muy pocos estudios sobre la caracterización parcial del fruto *Bactris guineensis* y la estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes, y considerando el potencial comercial de este cultivo, se planteó la presente investigación con el objetivo de determinar su valor como alimento funcional, tanto en la fruta fresca como en un jugo, con el fin de visualizar su uso como materia prima para la elaboración de productos de interés comercial. Una primera etapa correspondió a la caracterización nutricional completa del fruto fresco, mediante la determinación del aporte energético, contenido de fibra dietética, minerales, vitaminas, azúcares simples, ácidos orgánicos; además, se generó un perfil de los compuestos polifenólicos presentes y su actividad antioxidante. Seguidamente se evaluó el efecto de diversos procesos para la obtención de un jugo a escala piloto sobre los cambios a nivel de la composición de compuestos bioactivos (compuestos polifenólicos, vitamina C), así como en su capacidad antioxidante.

4 METODOLOGÍA

4.1 Localización del proyecto

El proyecto se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), y de la Escuela de Tecnología de Alimentos ubicados en la Universidad de Costa Rica (UCR), Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Se utilizó la Planta Piloto del CITA para el procesamiento de la fruta, así como los Laboratorios de Química del CITA y de la Escuela de Tecnología de Alimentos para los respectivos análisis fisicoquímicos de los productos obtenidos. Además, se trabajó en los laboratorios del CIPRONA (Centro de Investigación en Productos Naturales) de la UCR, específicamente con el equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) marca Waters Acquity.

4.2 Materia prima

El fruto de huiscoyol se recolectó en racimos, en la provincia de Guanacaste, en localidades cercanas a ríos y pantanos de la zona de Palo Verde y Cañas. La recolección se realizó durante los picos más altos de producción, los cuales fueron entre los meses de febrero-mayo y agosto-octubre. En los años 2014-2016, se recolectaron tres lotes de aproximadamente 10 kg de fruta cada uno. Estos se almacenaron en congelación a -20 °C por un período máximo de tres meses, hasta su procesamiento.

4.3 Determinación del perfil nutricional, composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC de la fruta fresca de huiscoyol

De la fruta recolectada se descongeló una muestra de aproximadamente 1 kg, la cual se lavó con agua potable sumergiéndola en una tina, luego se desinfectó por 20 min con una mezcla de perácidos (ácido peracético y ácido peroctanoico) en una concentración de 1 400 ppm. Luego se enjuagó con agua destilada y se dejó escurrir.

Se determinó el peso de 10 frutos y de cada uno de ellos se midió con una regla las dimensiones del fruto tanto a lo largo como a lo ancho según el anexo 1.

Con la ayuda de un cuchillo y de forma manual se separó la cáscara y la pulpa de la semilla. Se colocó la cáscara junto con la pulpa en una bolsa de polietileno transparente y se descartaron las semillas. Se procesaron aproximadamente 250 g de la pulpa con cáscara para realizar los análisis químicos en fresco correspondientes a: humedad, proteína, cenizas, grasa, minerales (Na, K, Fe y

Ca), fibra dietética, contenido de vitamina C total, acidez titulable, pH, color y grados Brix. El resto de la muestra se congeló a -20 °C y se liofilizó. El liofilizado se procesó en un molino Knifetec 1095 (Sample Mill, Foss Tecator), se empacó en bolsas metalizadas y se almacenó en congelación a -20 °C. Con esta porción de muestra se realizaron los análisis químicos de: azúcares por HPLC, capacidad antioxidante por el método ORAC, contenido de polifenoles totales con el reactivo de Folin, contenido de antocianinas totales y perfil de ácidos orgánicos y polifenoles por HPLC.

4.3.1 Diseño experimental y tratamiento estadístico

Se recolectaron tres lotes de aproximadamente 1 kg de frutos correspondientes a tres picos de cosecha diferentes en la misma zona geográfica (Cañas, Guanacaste), dos de ellos durante el 2014 en los meses de febrero y setiembre, el otro lote en agosto de 2016. Se realizó una caracterización física de los frutos para lo cual se midieron con la ayuda de un calibrador las dimensiones (diámetro longitudinal y ecuatorial) del fruto (Anexo 1), masa del mismo y el color.

Se determinaron parámetros a nivel de composición proximal y se midió el contenido de compuestos bioactivos, así como la capacidad antioxidante de la fruta de huiscoyol. Las variables analizadas fueron: humedad, proteína, cenizas, grasa, minerales (Na, K, Fe y Ca), azúcares por HPLC, fibra dietética, contenido de vitamina C, acidez, pH, color, grados Brix, capacidad antioxidante con el método ORAC, polifenoles totales, antocianinas totales y ácidos orgánicos por HPLC. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Junto a esta información se analizaron también los datos nutricionales obtenidos de otros tres lotes de huiscoyol que fueron cosechados en años anteriores. En marzo de 2007 se analizó un lote proveniente de Cañas y otro lote proveniente de Palo Verde, el tercer lote fue cosechado en julio del 2011 proveniente de Cañas.

Con estos seis lotes diferentes de fruta se calculó la media (\bar{x}) de cada una de las variables analizadas y se estimó un rango de valores con el fin de determinar la variabilidad estacional del fruto.

4.4 Efecto del procesamiento del jugo de huiscoyol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC

4.4.1 Procesamiento de la fruta fresca de huiscoyol para la obtención de jugo a escala laboratorio mediante cuatro diferentes tratamientos

Cada lote de fruta (10 kg) recolectado se descongeló a temperatura ambiente, se colocaron los tres lotes en una tina para formar una muestra compuesta y separar cada uno de los frutos de los racimos y seleccionar de manera manual los frutos de buena calidad según su color y textura. Se eliminaron aquellos que se encontraron inmaduros (verdes), con daño físico evidente o que presentaron contaminantes físicos como ramas y hojas o con contaminantes biológicos como moscas o gusanos.

Una vez seleccionados los frutos, la muestra compuesta de huiscoyol se dividió en tres partes iguales en masa que se rotularon como muestra 1 (M1), muestra 2 (M2) y muestra 3 (M3). Cada muestra se procesó de manera individual en días diferentes. Las muestras que no se procesaban se mantuvieron en congelación (-20 °C) según el diagrama de flujo expuesto en la Figura 12.

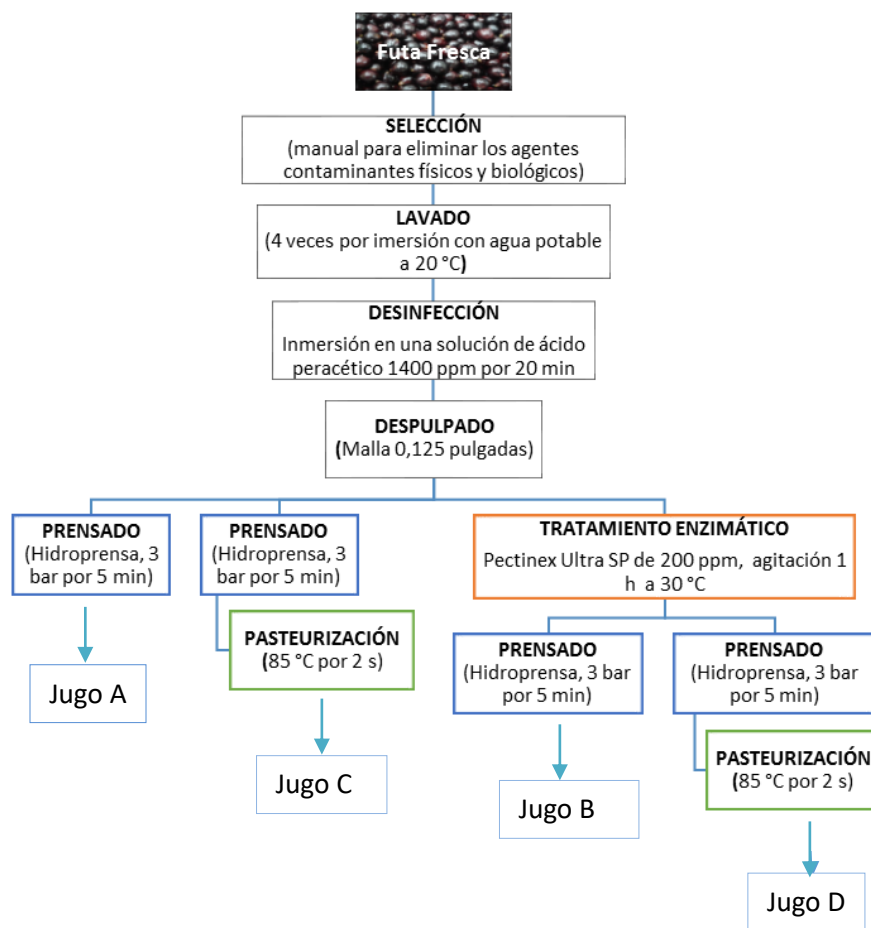


Figura 12. Flujo de proceso para la obtención de cuatro diferentes tipos de jugo de huiscoyol a escala piloto.

Una vez descongelada la muestra a procesar, se lavaron los frutos cuatro veces por inmersión con agua potable, se dejaron escurrir y luego se desinfectaron utilizando una disolución disolución Vortex a 1 400 ppm. La desinfección se llevó a cabo por inmersión durante 20 min, luego de ese tiempo se dejaron escurrir los frutos y se enjuagaron con agua destilada.

4.4.1.1 Despulpado de los frutos de huiscoyal

Luego del lavado y la desinfección se procedió a separar la pulpa de la semilla, para lo cual se utilizó una despulpadora (Marca Carver, Modelo: 3351-0, Estados Unidos) provista de una malla con un tamaño de abertura de 0,125 pulgadas. Para realizar este procedimiento se añadió lentamente la fruta de manera que se lograra desprender la mayor parte de la pulpa.

La pulpa y la cáscara se recolectaron en un balde plástico, se pesó el contenido para conocer el rendimiento del proceso. En otro recipiente plástico se recolectó el residuo, correspondiente a semillas con parte de la pulpa que no se pudo desprender.

Se mezclaron homogéneamente la pulpa con cáscara y el residuo, el contenido se dividió en dos partes iguales de masa. A una porción se le aplicaron los tratamientos el tratamiento 1 y 3 para obtener los jugos A y C respectivamente; a la segunda porción se le aplicaron los tratamientos 2 y 4 para obtener los jugos B y D respectivamente, según lo estipulado en la Figura 12.

4.4.1.2 Tratamiento 1: Prensado, obtención del jugo A

La primera porción de pulpa y residuo (aproximadamente 5 kg) se colocó dentro de un medio filtrante con una abertura de poro inferior a 1 mm, éste se colocó en una hidroprensa de 40 L de capacidad (Enotecnica Pillan S.R.L., modelo Carezza, Italia) y se aplicó una presión de 3 bar según indicación del manómetro durante 5 min. Se recolectó el líquido en un recipiente, el cual se pesó para la determinación del rendimiento de extracción. El jugo obtenido se fraccionó en dos partes: una porción se etiquetó como jugo A y se almacenó en bolsas metalizadas de 250 mL, el cual se mantuvo en congelación a -20°C hasta que se realizaron los análisis químicos y físicos correspondientes. La segunda porción de jugo se utilizó para realizar el tratamiento 3 y obtener el jugo C.

4.4.1.3 Tratamiento 2: maceración enzimática y prensado, obtención del jugo B

La segunda porción de pulpa y residuo (aproximadamente 5 kg) que quedó después del despulpado se colocó en un recipiente de acero inoxidable y se le aplicó un tratamiento enzimático,

el cual consistió en la adición del preparado comercial Pectinex Ultra SP (Novozymes, Dinamarca). La actividad pectinolítica es la principal de este preparado enzimático, que actúa en la ruptura de polisacáridos como pectinas presentes en el tejido vegetal; la enzima declarada es la poligalacturonasa, activa a 30-50 °C y a pH 4-9. La pulpa se calentó con agitación constante de manera que la temperatura se mantuviera en 30-35°C, una vez que se alcanzó ese rango de temperatura se adicionó una concentración del preparado de 200 ppm y se mantuvo en agitación constante por 1 h, con el fin de que la enzima actuase de manera homogénea. Luego de ese tiempo se dejó enfriar y se procedió a prensar la pulpa tratada con la ayuda de la hidroprensa a 3 bares de presión por 5 min recubierta con una malla como medio filtrante. Se recolectó el líquido en un recipiente, el cual se pesó para la determinación del rendimiento del tratamiento enzimático. El jugo se fraccionó en dos partes: una porción se etiquetó como Jugo B, el cual se almacenó en bolsas metalizadas de 250 mL y se mantuvo en congelación a -20 °C hasta realizar los análisis que correspondían. La segunda porción será utilizada para el tratamiento 4 y la obtención del Jugo D.

4.4.1.4 Tratamiento 3: Prensado-pasteurizado, obtención del jugo C

A la segunda porción del jugo prensado de la sección 4.4.1.2. se le aplicó un tratamiento térmico; para ello se colocó una porción de 500 mL en un beaker de acero inoxidable de 1 000 mL, se calentó con la ayuda de una plantilla de calentamiento hasta que el líquido en agitación constante alcanzara una temperatura de 85 °C, se dejó aproximadamente de 2 a 5 s a esa temperatura. Se envasó en caliente, con la ayuda de un embudo, en botellas de vidrio de 250 mL, se taparon e inmediatamente después se invirtieron para esterilizar la tapa. Luego se sumergieron las botellas en un baño de agua con hielo hasta atemperar. Esta porción de jugo se etiquetó como Jugo C. Para su almacenamiento se trasvasó el líquido a bolsas metalizadas de 250 mL que se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta realizar los análisis que correspondían.

4.4.1.5 Tratamiento 4: maceración enzimática-prensado-pasteurizado, obtención del jugo D

De la segunda porción del jugo obtenido mediante el tratamiento 2, se tomó una porción de 500 mL en un beaker de acero inoxidable de 1 000 mL, se calentó con la ayuda de una plantilla de calentamiento hasta que el líquido en agitación constante alcanzara una temperatura de 85 °C, se dejó aproximadamente de 2 a 5 s a esa temperatura. Se envasó en caliente, con la ayuda de un embudo, en botellas de vidrio de 250 mL, se taparon e inmediatamente después se invirtieron para esterilizar la tapa. Luego se sumergieron las botellas en un baño de agua con hielo hasta atemperar. Esta porción se etiquetó como Jugo D. Para su almacenamiento se trasvasó el líquido a bolsas

metalizadas de 250 mL que se mantuvieron en congelación a -20°C hasta realizar los análisis que correspondían.

4.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se evaluaron cuatro diferentes tratamientos a la fruta fresca de huiscoyol para la obtención de jugo: 1) Prensado (Jugo A), 2) Prensado-pasteurizado (Jugo B), 3) Tratado enzimáticamente-prensado (Jugo C) y 4) Tratado enzimáticamente-prensado-pasteurizado (Jugo D).

Con el fin de determinar el impacto del procesamiento en la capacidad antioxidante y en el contenido de compuestos bioactivos, se planteó un diseño irrestricto aleatorio, con cuatro tratamientos que correspondieron a cada tipo de muestra (Jugo A, B, C y D). Se evaluaron como variables respuesta: acidez titulable, pH, sólidos solubles, contenido de polifenoles totales, contenido de antocianinas totales, contenido de vitamina C total, contenido de azúcares, contenido de ácidos orgánicos y actividad antioxidante por el método ORAC.

Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y se estimó una media (\bar{x}) para cada una de las variables evaluadas, así como su desviación estándar. Se determinó si existe alguna diferencia significativa entre las medias por medio de un ANDEVA estipulando como parámetro un valor de probabilidad (valor p) $p \leq 0,05$. Se aplicó una prueba Tukey para verificar cuáles medias de las variables respuesta en cada tratamiento fueron significativamente diferentes y se identificaron con letras diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa JMP-SAS versión 9.

4.5 Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC del jugo prensado de huiscoyol

Con el fin de conocer el perfil nutricional del jugo mínimamente procesado de huiscoyol se analizó el jugo A obtenido del tratamiento 1, el cual presentó en pruebas preliminares la mayor capacidad antioxidante determinada por el método ORAC. El jugo prensado se obtuvo según la metodología propuesta en la sección 4.4.1.2. De cada uno de las tres muestras que se procesaron se descongeló a temperatura ambiente una porción de 500 mL, la cual se dividió en dos, una porción de 250 mL para realizar los análisis químicos en fresco, y una segunda fracción de 250 mL que se congeló a -20°C y se liofilizó para realizar los análisis de compuestos bioactivos.

4.5.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Las variables analizadas para las tres muestras de jugo prensado fueron: humedad, proteína, cenizas, grasa, minerales (Na, K, Fe y Ca), azúcares por HPLC, fibra dietética, contenido de vitamina C, acidez titulable, pH, color, grados Brix, capacidad antioxidante con el método ORAC, polifenoles totales, antocianinas totales y ácidos orgánicos por HPLC. Todos los análisis se realizaron por duplicado, excepto para el método ORAC que se efectuó por sextuplicado.

Con los valores obtenidos para cada una de las tres muestras de jugo prensado se calculó una media (\bar{x}) para cada una de los parámetros evaluados con su respectiva desviación estándar (SD).

4.6 Identificación de los compuestos polifenólicos mayoritarios de la fruta de huiscoyol y sus cambios producidos luego del procesamiento.

Con el fin de conocer el perfil de polifenoles totales presentes en el fruto de huiscoyol y determinar los cambios en los principales compuestos durante el procesamiento, se tomaron 0,5000 g de cada una de las muestras liofilizadas, tanto de la fruta fresca como de los jugos A, B, C y D. Se realizó una extracción múltiple (tres extracciones con 15 mL de una solución acetona: agua 70:30), se agitó por 10 min en agitador orbital y 10 min en baño ultrasónico. El extracto se filtró en un balón de 250 mL de fondo plano 24/40 y se evaporó el disolvente hasta un 90 % aproximadamente con ayuda de un rotavapor a 40 °C. El extracto concentrado se filtró empleando un filtro microporo de celulosa regenerada de 0,45 μ m sobre un balón aforado de 25 mL y se llevó a la marca de aforo con agua grado HPLC.

Para la caracterización e identificación tentativa de los compuestos polifenólicos se inyectó 10 μ L de un extracto de polifenoles de fruta fresca en el UPLC-MS marca Waters Acquity equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) acoplado a un detector de masas ESI-Q-TOF/MS (*Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*). La separación se logró con una columna C-18 Acquity UPLC CSH (Waters) 2,1 mm x 100 mm, 1,7 μ m con una pre-columna (2,1 mm, 0,2 μ m). Se usó como sistema de fases móviles: ácido fórmico 0,1 % como fase móvil A y acetonitrilo: ácido fórmico 0,1 % como fase móvil B. Se utilizó un sistema de gradiente de la siguiente manera: 0-2 min 98 % A, 2-5 min 90 % A, 5-12 min 85 % A, 12-16 min 75 % A, 16-18 min 2 % A, 18-19 min 2 % A, 19-20 min 98 % A, 20-22 min 98 %, con un flujo de 0,3 mL/min a 30 °C. Las masas fueron adquiridas en modo positivo y negativo, realizando un *scan* de m/z 50 a m/z 5000.

Se obtuvieron los cromatogramas de la fruta fresca, tanto en modo positivo como en modo negativo y se realizó la fragmentación de cada uno de los picos obtenidos en ambos modos según la masa del ion padre detectado. Se determinó tentativamente la identidad de cada compuesto mayoritario presente en la fruta fresca mediante el análisis de su espectro de masas, el patrón de fraccionamiento y el uso de bases de datos existentes (Mzcloud, Massbank, MetLin, HMDB).

Para observar si existen cambios en el perfil de compuestos según el tratamiento aplicado a los jugos obtenidos a escala piloto, se inyectaron extractos de polifenoles de cada jugo en HPLC-DAD marca Shimadzu equipado con un detector de arreglo de diodos. La separación se logró con una columna Phenomenex Luna 5 μm C18 100A, tamaño 150 mm x 2.00 mm y su respectiva columna. Se usó como sistema de fases móviles: ácido fórmico 2% como fase móvil A y acetonitrilo 80 % ácido fórmico 2 % como fase móvil B. Se utilizó un sistema de gradiente de la siguiente manera: 0 a 20 min de 5 a 25 % B, 20 a 25 min de 25 a 100 % B, 25 a 30 min de 100 a 10 % B, 30 a 40 min, de 10 a 5 % B; con un flujo de 0,3 mL/min a 30 °C. Las señales fueron detectadas y analizadas a 280 nm.

4.6.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Se planteó un diseño irrestricto aleatorio cuyos factores correspondieron al tipo de producto: jugo prensado (A), jugo prensado-pasteurizado (B), jugo tratado enzimáticamente-prensado (C) y jugo tratado enzimáticamente-prensado-pasteurizado (D). La variable respuesta fue el porcentaje relativo de cada compuesto. Se obtuvo el cromatograma a 280 nm y de cada una de las señales se generó el área bajo de la curva. Con este valor y el área total se calculó el porcentaje relativo de cada uno de los compuestos. Se realizó el análisis estadístico con aquellos compuestos que presentaron un porcentaje por encima del 1 %. Se determinó si existe alguna diferencia significativa entre las medias por medio de un ANDEVA estipulando como parámetro de probabilidad (valor p) un valor de $p \leq 0,05$. Se aplicó una prueba de comparación de medias Tukey para determinar cuáles medias de las variables respuesta en cada tratamiento fueron significativamente diferentes y se identificaron con letras diferentes. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa JMP-SAS versión 9.

4.7 Métodos de análisis químicos aplicados en la fruta fresca y en los jugos obtenidos de huiscoyol

Para la caracterización nutricional de la fruta fresca y del jugo prensado, así como para la evaluación del impacto de los cuatro tratamientos sobre el contenido de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante, se realizó una serie de análisis químicos que se describen a continuación.

4.7.1 Reactivos

Sacarosa, glucosa, fructosa, ácido gálico, ácido ascórbico (AA), ácido metafosfórico (MPA), hidrocloreuro de Tris[2-carboxiethyl]fosfina, ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico, reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido 6-hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) y la fluoresceína disódica fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El dihidrocloreuro de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) fue obtenido de Wako International (Cape Charles, VA, USA). Los solventes utilizados como acetonitrilo, acetona y metanol fueron grado HPLC y UPLC de la marca Merck-Millipore Merck (KGaA, Darmstadt Alemania).

4.7.2 Métodos de análisis

Determinación del pH: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-012 (CITA 2014 a), con base en el método 981.12 AOAC 2012 con algunas modificaciones

Determinación de la acidez titulable: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-011 con base en el método 942.15 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 b).

Determinación del contenido de sólidos solubles (°Brix): Se determinó mediante el método P-SA-MQ-046 con base en el método 932.12 AOAC-2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 c).

Determinación de la humedad: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-002, con base en el método 920.151 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 d).

Determinación del contenido de proteína: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-003 con base en el método 920.152 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 e).

Determinación del contenido de grasa: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-005 con base en el en el método desarrollado por Carpenter *et al.* (1993) con algunas modificaciones (CITA, 2014 f).

Determinación del contenido de cenizas: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-004, con base en el en el método 940.26 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 g).

Determinación del contenido de fibra dietética: Se determinó mediante el método P-SA-MQ-007 con base en el método 985.29 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 h).

Determinación del contenido de minerales (sodio, potasio, calcio y hierro): Se determinó mediante el método P-SA-MQ-035, con base en los métodos 985.35 y 999.11 AOAC 2012 con algunas modificaciones (CITA, 2014 i).

Determinación del color: Se determinó mediante el método descrito en el documento interno del CITA P-SA-MQ-045, basado en ColorFlex (2013) (CITA, 2014 j) con algunas modificaciones. Se determinaron los parámetros L^* , a^* y b^* y se calcularon los valores de C^* y h según las ecuaciones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*) \quad (2)$$

Determinación del contenido de azúcares por HPLC: Se determinó mediante el método descrito en el documento interno del CITA P-SA-MQ-006 (CITA 2014 k), elaborado por el Laboratorio de Química del CITA. Una muestra representativa de liofilizado 0,5 g se extrajo con 100 g de agua tipo 1 [$0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ at 25°C , $5 \mu\text{g/L}$ TOC, A10 Milli-Q Advantage System] (Merck KGaA, Darmstadt Alemania)], agitando por 20 min, luego se centrifugó y se filtró empleando un filtro de membrana de celulosa regenerada de $0,45 \mu\text{m}$. Las extracciones se realizaron por duplicado. La identificación se realizó con utilizando un equipo HPLC-RID (LC-10A HPLC Series, Shimadzu, Kyoto, Japan) y la separación se logró mediante una columna amino (Zorbax Carbohydrate $5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las condiciones analíticas fueron: un flujo de $1,2 \text{ mL/min}$, 30°C ; una mezcla de acetonitrilo: agua (75:25), en modo isocrático durante 20 min. La identificación de cada uno de los azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) fue obtenida utilizando estándares comparando los tiempos de retención, mientras que su cuantificación se realizó con una curva de calibración con una linealidad en el rango de los $0,1\text{-}1,0 \text{ g azúcar} / 100 \text{ g}$ y un $r = 0.9995$. La concentración de cada azúcar fue expresada en gramos de azúcar por 100 g de muestra fresca.

Determinación de vitamina C total por HPLC: Se determinó mediante el método descrito en el documento interno del CITA P-SA-MQ-024 (CITA, 2014 l). El contenido de ácido ascórbico (AA) y ácido deshidroascórbico (DHA) se determinó de acuerdo con Hernández *et al.* (2006) y Lykkesfeldt (2000). La submuestra de fruta fresca se pesó (5-10 g) y se mezcló con 15-20 mL de la solución extractora (0,04% de ácido metafosfórico). La mezcla se homogenizó en vórtex durante 1 min, luego se

centrifugó a 4 500 rpm (4 °C) durante 10 min. Este procedimiento se repitió dos veces y los dos sobrenadantes resultantes se mezclaron juntos en un balón de 50 mL y se aforó con la solución extractora. Luego se tomó una alícuota de extracto y se colocó en una jeringa con un filtro de microporo de celulosa regenerada (0,45 o 0,20) μm , se filtró en un vial de 2 mL. Para reducir el DHA a AA, se tomó 500 μL de extracto y se le añadió 500 μL de clorhidrato de Tris [2-carboxietil] fosfina (40 mmol / L), se calentó a 30 °C durante 40 min. El extracto inicial y el extracto reducido se inyectaron en el equipo HPLC-UV (Serie LC-10A HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japón). El AA se analizó en una columna C18 (Phenomenex Luna 5 μm , 100 Å, 250 mm x 4,60 mm). Las condiciones analíticas usadas fueron las siguientes: 30 °C, flujo 0,8 mL/min; eluyente H_2SO_4 (1,8 mM, pH 2,60) condición isocrática en 20 min a 245 nm. El análisis se realizó por duplicado. La identificación del ácido ascórbico se obtuvo mediante el uso de patrones y la comparación de los tiempos de retención, mientras que la cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración externas con un rango de linealidad de 7,5-150 mg AA / L y $r = 0,9996$. La concentración de vitamina C total se reportó como mg de vitamina C total por 100 g de muestra fresca.

Extracción de polifenoles: Los extractos se prepararon de acuerdo con Georgé *et al.* (2005). Se extrajo una submuestra de 0,5 g de material liofilizado con 30 mL de solución de acetona (70/30 de agua destilada), la mezcla se agitó magnéticamente durante 15 min y luego se sonicó durante otros 15 min. Los sobrenadantes de la mezcla se recuperaron después por filtración (Whatman, Maidstone, Reino Unido) y se evaporaron a vacío a 40 °C hasta que se eliminó casi todo el disolvente. El extracto restante se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua tipo I. Este extracto rico en polifenoles se utilizó para los siguientes análisis: contenido de polifenoles totales, contenido de antocianinas totales, actividad antioxidante (análisis ORAC), ácidos orgánicos. La extracción se realizó por triplicado.

Análisis de antocianinas totales: El contenido de antocianinas monoméricas totales se determinó usando el método diferencial de pH según el AOAC 2005.02 descrito en el P-SA-MQ-047 (CITA 2014 n). El extracto rico en compuestos polifenólicos se diluyó en una proporción 1: 5 en buffer de cloruro de potasio 25 mM a pH 1,0 y buffer de acetato de sodio 0,4 M a pH 4,5, respectivamente. La absorbancia de las soluciones se midió espectrofotométricamente a 510 y 700 nm (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Tokio, Japón). La diferencia de absorbancia A se calculó como:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad (3)$$

La concentración total de antocianinas C (mg/L) se expresó como mg de equivalentes de cianidin-3-glucósido de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = A \cdot MW \cdot DF \cdot 1000 / (\epsilon \cdot l) \quad (4)$$

Con MW, peso molecular para cianidin-3-glucósido (449,2 g mol⁻¹); DF, factor de dilución; l, longitud del camino en cm; ϵ , coeficiente de extinción molar para cianidin-3-glucósido (26900 L mol⁻¹ cm⁻¹); 1000, conversión de g a mg. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis de polifenoles totales: Se determinó con el método descrito en el protocolo P-SA-MQ-048 (CITA 2014 o), usando el método espectrofotométrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu modificado según lo descrito por Georgé *et al.* (2005). Se usó ácido gálico como estándar, y se eliminaron las interferencias del ácido ascórbico y azúcares reductores usando cartuchos OASIS® (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Tokio, Japón) a una longitud de onda de 765 nm frente a un blanco de reactivo. Los polifenoles se cuantificaron usando una curva de calibración externa de ácido gálico con un rango de linealidad de 10-80 mg GAE / L y $r^2 = 0,9996$. La concentración de polifenoles totales se reportó como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra fresca. Todos los análisis se realizaron por triplicado

Determinación de ácidos orgánicos por HPLC: Se determinó mediante el método descrito en el documento interno del CITA P-SA-MQ-051 (CITA 2009 m). Se extrajeron 500 µL de extracto rico en polifenoles con cartuchos OASIS® (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). Con 2,5 mL de agua tipo I, se inyectó el filtrado en el equipo HPLC-DAD (Serie LC-10A HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japón). Se analizó cada ácido orgánico en una columna de intercambio iónico (Hi-Plex H 300 mm x 7,8 mm, 8 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) Las condiciones analíticas utilizadas fueron: flujo 0,6 mL/min, 60 ° C; eluyente H₂SO₄ (2,25 mM), condición isocrática durante 40 min a 210 nm. El análisis se realizó por triplicado. La identificación de cada ácido orgánico se obtuvo utilizando patrones comparando los tiempos de retención, mientras que la cuantificación se realizó mediante curvas de calibración externas con un rango de linealidad de 50,0-1 000,0 mg de ácido orgánico / L y un $r^2 = 0,9996$. La concentración de cada orgánico se reportó como miligramos de ácido orgánico por 100 g de muestra fresca

Capacidad antioxidante ORAC: La capacidad de absorbancia del radical de oxígeno hidrófilo (H-ORAC) se determinó de acuerdo con Huang *et al.* (2002) y en el protocolo P-SA-MQ-037 (CITA, 2010

p). Los análisis se llevaron a cabo usando un espectrofluorómetro (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.), usando placas de polipropileno de 96 pocillos, con fluoresceína como indicador del daño por radicales peroxilo. La longitud de onda de excitación se ajustó a 493 nm y la longitud de onda de emisión a 515 nm. Las soluciones se prepararon con buffer de fosfato (75 mM, pH 7,4). Cada pocillo se llenó con 150 μ L de fluoresceína y 25 μ L de tampón (blanco), o soluciones de Trolox estándar o una muestra de una dilución apropiada. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min, y luego se añadieron 25 μ L de solución de AAPH. Después de la adición de AAPH y la posterior agitación, se midió la disminución de la fluorescencia cada minuto durante 45 min a 37 °C. El valor H-ORAC se expresó como micromoles (μ mol) de equivalentes Trolox (TE) por 100 g, usando una curva de calibración externa de Trolox 4,0-32,3 μ mol TE / L y $r^2 = 0,9993$.

5 Discusión de resultados

5.1 Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC de la fruta fresca de huiscoyol para determinar su valor como alimento funcional

5.1.1 Características físicoquímicas del fruto de huiscoyol

El primer objetivo que se planteó fue la caracterización físico-química de los frutos, ya que no hay investigaciones sobre este tema. Se evaluaron parámetros como peso del fruto (g), diámetro ecuatorial y diámetro (cm) y el color de los frutos evaluando los parámetros L^* , a^* , b^* , C^* y h° en el colorímetro Hunter Lab, dichos valores se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros de peso y dimensiones del fruto (n= 10) y el color L^* , a^* y b^* de la pulpa y cáscara (n= 6) de la fruta fresca de *Bactris guineensis*.

Parámetro físico	($\bar{x} \pm SD$)	Parámetros de color	Intervalo de valores
Peso (g)	3,6 \pm 0,6	L^*	16,65-20,81
Diámetro (cm)	1,5 \pm 0,1	a^*	14,89-27,55
		b^*	2,85-9,52
		C^*	15,16-29,12
Diámetro ecuatorial (cm)	1,8 \pm 0,1	h°	70,95-79,20

\bar{x} : media, SD: desviación estándar

Los frutos de huiscoyol cuando se encuentran en un estado de inmadurez son de color verde (Figura 13 a), conforme van madurando el color es cada vez más rojizo (Figura 13 b) y éste va haciéndose cada vez más oscuro hasta llegar a un color púrpura oscuro (Figura 13 c). Según la escala de CIE $L^*a^*b^*$ el valor bajo de L^* muestra una luminosidad baja, colores oscuros; los valores positivos y altos de a^* así como los valores bajos y positivos de b^* muestran que la coloración se encuentra en el rango de los rojizos, los cuales se pueden corroborar en la Figura 13b, los valores obtenidos de color son bajos en comparación con los obtenidos por Osorio *et al.*, 2010, debido posiblemente al estado de maduración del fruto.



Figura 13 . Frutos de huiscoyol según su estado de maduración a) verde, b) intermedio y c) maduro. Fuente: https://www.palmpedia.net/wiki/Bactris_guineensis

La coloración rojiza oscura y púrpura en frutos como moras, arándanos rojos y azules, fresas, frambuesas, uvas, es comúnmente asociado a la alta presencia de compuestos polifenólicos de la familia de las antocianinas, tales como la pelargonidina responsable del color rojo, la cianidina a la que se le atribuye el color magenta y los colores azules se le atribuyen a la delfinifina (Florian *et al.*, 2002; Castañeda & Guerrero, 2015). El contenido de antocianinas y, por consiguiente, el color de las frutas se ha asociado al nivel de maduración de los mismos, por ende, el color puede utilizarse como un parámetro de selección de los frutos y de calidad (Peña-Varela *et al.*, 2006; Begoña de Ancos *et al.*, 1999).

Una vez caracterizado el huiscoyol a nivel físico se procedió a realizar los análisis químicos relacionados con el perfil nutricional correspondientes a: el contenido de humedad, cenizas, proteína, grasa, minerales, carbohidratos totales y fibra dietética y acidez. Estos se realizaron a tres lotes de frutos cosechados en los años 2014 y 2016 en la zona de Cañas. Junto con estos, se recopiló información de otros tres lotes de frutos cosechados en los años 2007 y 2011 de la zona de Palo Verde y de Cañas, cuyas cosechas fueron en los periodos comprendidos entre febrero-mayo, y agosto-octubre. Los valores nutricionales se pueden observar en el Cuadro 3, como un intervalo del

valor mínimo al valor máximo, ya que los valores promedio de cada uno de los lotes presentan una alta variabilidad entre ellos. Lo anterior debido a que las condiciones climáticas fueron muy diferentes durante los periodos de cosecha, por ejemplo, en marzo del 2007 se presentó un promedio de 317 mm de lluvias acumuladas en el Pacífico Norte, en julio del 2011 fue de 311 mm, en marzo de 2014 de 0 mm, en setiembre 2014 de 363 mm y en agosto de 2016 de 185 mm (Fuente: Boletín meteorológico mensual del IMN visitado en <https://www.imn.ac.cr/boletin-meteorologico> el 05/10/2018).

Cuadro 3. Parámetros nutricionales determinados en la parte comestible (pulpa y cáscara) de la fruta de *Bactris guineensis* (n= 6) en base fresca.

Parámetros nutricionales	Intervalo de valores (mín.-máx.)	($\bar{x} \pm SD$)
Humedad (g/100 g)	65,5-84,0	70,3 \pm 8,8
Cenizas (g/100 g)	0,59-1,55	0,99 \pm 0,38
Proteína (g/100 g)	0,60-1,96	1,47 \pm 0,51
Grasa (g/100 g)	0,040-0,100	0,081 \pm 0,052
Carbohidratos totales (g/100 g)	17,1-35,0	20,3 \pm 8,1
Fibra dietética (g/100 g)	2,8-9,9	7,3 \pm 2,5
Sólidos totales solubles (°Brix)	15,6-31,7	25,8 \pm 7,9
pH	2,48-3,39	2,89 \pm 0,34
Acidez titulable (g equivalentes de ácido succínico /100 g)	1,90-3,80	2,35 \pm 0,73
Minerales (mg/100 g)		
Sodio	4,1-10,3	7,0 \pm 3,1
Potasio	248-421	307 \pm 98
Calcio	16,16-21,15	18,5 \pm 2,5
Hierro	0,66-0,77	0,714 \pm 0,076

\bar{x} : media, SD: desviación estándar

Los sólidos totales representan como máximo un 34,5 % del fruto y en su mayoría corresponden a carbohidratos simples; esto puede verse reflejado en el 66 % de pulpa que constituye el fruto y que, además, podría afectar las propiedades físicas del jugo, como la densidad, la viscosidad y el índice de refracción. La viscosidad y la densidad de los jugos y su dependencia con la concentración de los sólidos totales son muy importantes para la industria de alimentos en el diseño y la optimización de varias operaciones (Brousse *et al.*, 2010).

El contenido de proteína (0,60 - 1,96) g /100 g es semejante al contenido de otras frutas, como se puede consultar en distintas tablas de composición de frutas y vegetales elaboradas por el INCAP (Menchu & Méndez, 2007) y USDA (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>). En estas tablas se observa que el limón agrio presenta un contenido de 1,10 g /100 g en proteína, la mandarina de 0,81 g /100 g, el cas de 1,20 g /100 g, la fresa 0,67 g /100 g, el kiwi 1,14 g /100 g. Si se compara el contenido de proteína del huiscoyol con el de diferentes tipos de uva, las cuales presentan como máximo 0,20 g /100 g de peso fresco, el *B. guineensis* es más rico en proteína (Monteiro *et al.*, 2003), pero su contenido es menor al del pejibaye, 2,60 g/ 100 g (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2016).

El pejibaye pertenece al mismo género del huiscoyol, es un fruto que se obtiene de una palma y es conocido científicamente como *Bactris gasipaes*, pero su perfil nutricional es muy diferente al del huiscoyol; como se mencionó antes, el *B. gasipaes* presenta un contenido superior de proteína, y en lo que respecta al contenido de grasa también es mayor, 7,22 g/100 g (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2016), ya que el contenido de grasa del huiscoyol es menor a 0,1 g /100 g, valor que comparado con el de otras frutas es muy bajo, ya que se reportan contenidos de 0,2 a 1,5 g /100 g (Menchu & Méndez, 2007).

Las cenizas que se reportan en la recopilación del INCAP del 2007 muestran en su mayoría valores inferiores al 1,5 g /100 g, con excepción del tamarindo (2,6 g /100 g), el rambután (2,0 g/100 g), y la pera (3,10 g /100 g), entre otros. El contenido máximo de cenizas determinado en el huiscoyol es 1,55 g /100 g. Se cuantificaron minerales como sodio, calcio e hierro, cuyos valores obtenidos son muy parecidos a los reportados en otras frutas (Menchu & Méndez, 2007); mientras que en el caso del potasio, el huiscoyol presenta un valor alto (máximo determinado de 421 mg /100 g) correspondiente a un 12 % del valor recomendado diario (% VRN), comparable con frutos como albaricoques (259 mg /100 g), higos (232 mg /100 g), aguacate 485 mg /100 g, guayaba (284 mg/100 g) y banano (358 mg /100 g) (Menchu & Méndez, 2007).

Con respecto a los carbohidratos totales, éstos son calculados por diferencia y se obtiene para el huiscoyol un valor máximo de 35 g /100 g. De estos carbohidratos una parte corresponde a la fibra dietética, la cual es muy importante a nivel nutricional ya que permite el buen funcionamiento del sistema digestivo y es un parámetro que se busca para la elaboración de alimentos funcionales (Aleixandre & Miguel, 2008). Entre las frutas ricas en fibra dietética se encuentran el coco con un 9%, el aguacate con un 6,7 %, la frambuesa con un 6,5 %, la guayaba con un 5,4 %, el arándano rojo con un 4,6 %, mientras que las manzanas presentan un contenido de 2,0

%, las uvas de 1,0 y el kiwi de 3,9 % (Dhingra *et al.*, 2012). En el caso del huiscoyol, la fibra dietética puede llegar a ser hasta un 10 % del fruto, por lo que puede considerarse, según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 de etiquetado nutricional, como una buena fuente de fibra dietética (mínimo 3 g /100 g).

5.1.2 Metabolitos primarios y secundarios analizados en la fruta fresca

Como parte de la caracterización de la pulpa y la cáscara de la fruta de *Bactris guineensis* se identificaron los metabolitos primarios como los azúcares simples y los metabolitos secundarios como la vitamina C total y los ácidos orgánicos, la información está recopilada en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Metabolitos primarios y secundarios identificados en la parte comestible (pulpa y cáscara) de la fruta de *Bactris guineensis* (n=6) en base fresca.

Metabolito	Rango de valores (mín.-máx.)	($\bar{x} \pm SD$)
Azúcares simples		
Sacarosa (g/100 g)	ND ^a -3,6	-
Fructosa (g/100 g)	3,00-11,00	6,6 \pm 2,5
Glucosa (g/100 g)	4,06-10,60	6,8 \pm 2,7
Ácidos orgánicos		
Ácido cítrico (mg/100 g)	30-240	130 \pm 105
Ácido málico (mg/100 g)	37-1 000	527 \pm 417
Ácido succínico (mg/100 g)	1 000-1 580	1 268 \pm 292
Vitaminas hidrosolubles		
Vitamina C total (mg/100 g)	ND ^b -48	-

a ND: No detectable, menos de 0,010 g/100 g : b. No detectable menos de 1,43 mg/100 g. \bar{x} : media, SD: desviación estándar

El fruto del huiscoyol contiene como carbohidratos disponibles alrededor de un 25 %, los cuales corresponden en su mayoría a azúcares simples. Al analizar un extracto acuoso de la fruta se identificaron los azúcares más comunes en las frutas, la glucosa y fructosa; la sacarosa fue, en los lotes del 2014 y 2016 no detectable, en el caso del 2011 y 2007 el valor fue detectable no cuantificable, mientras que el único lote del 2007, fue el que presentó un valor de sacarosa de 3,6 g /100 g, posiblemente debido al estado de maduración del fruto.

Como parte de los sólidos solubles presentes en el huiscoyol se encuentran los ácidos orgánicos, estos juegan un papel importante en las frutas, ya que pueden modificar a nivel metabólico el apetito y facilitar la digestión y permitir la estabilización de algunas vitaminas hidrosolubles como las del complejo B y la vitamina C, además de reducir su susceptibilidad hacia la

luz (Shan *et al.*, 2011) y aumentar la absorción de minerales como el potasio, así como promover el metabolismo de cobre, zinc y calcio (Russell, 1992; Scheible *et al.*, 1997).

Se realizó el análisis de los ácidos orgánicos presentes en el fruto de huiscoyol, esto mediante la técnica de HPLC. Se identificaron tres ácidos orgánicos (Figura 14), el ácido cítrico (a), (±) el ácido málico (b) y el ácido succínico (c), siendo este último el mayoritario. Esto es muy particular, ya que, normalmente el ácido succínico está presente en baja concentración en frutas; mientras que los ácidos cítrico y málico son generalmente los principales ácidos orgánicos, como en el caso de las bayas (fresa, frambruesa, zarzamoras) (Mikulic *et al.*, 2012) y en cítricos como limón, naranja, lima (Penniston *et al.*, 2008).

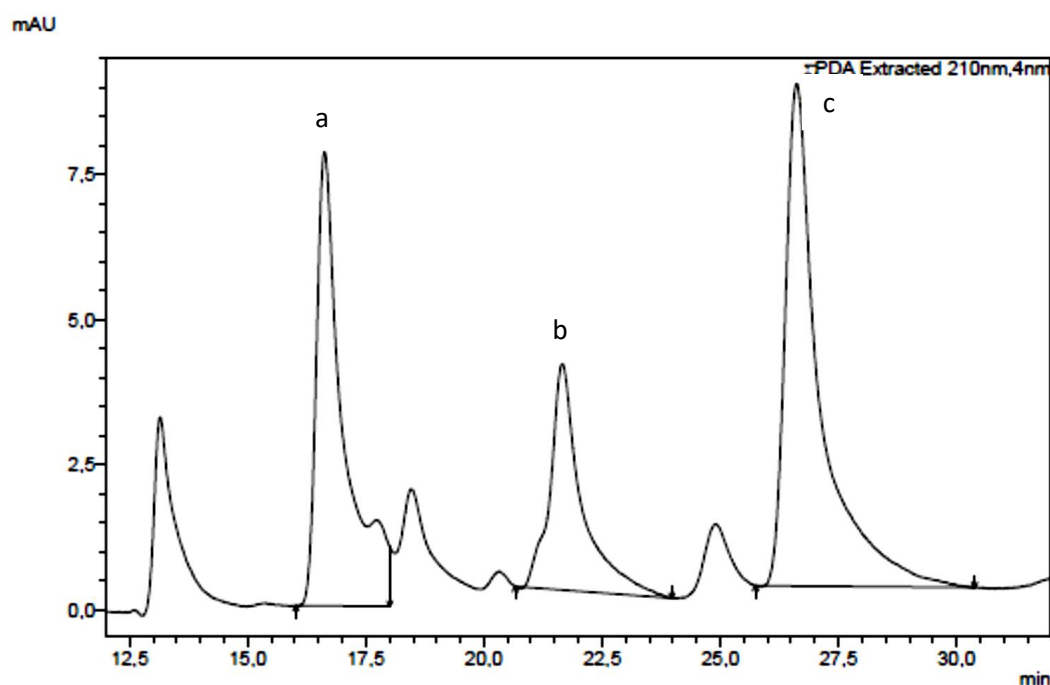


Figura 14. Cromatograma de separación de a) ácido cítrico, b) ácido málico y c) ácido succínico en una muestra de huiscoyol fresco (Lote 2014) por HPLC-DAD a 210 nm, 0,6 mL/min, 60 °C, H₂SO₄ 2,25 mM.

Se puede establecer una relación entre la cantidad de azúcares con la acidez de la fruta que se conoce como relación SST/Acidez y es una característica clave para la determinación del sabor, textura y sensación háptica de los segmentos del fruto. Se utiliza en algunos frutos como cítricos y bayas como indicador sensorial y comercial de madurez. En el comienzo del proceso de maduración, la relación azúcar/ácidos es baja debido al bajo contenido de azúcar y alto contenido de ácidos, lo que provoca que el fruto tenga un sabor ácido en esta fase; conforme pasa el proceso de maduración, los ácidos de los frutos son degradados y el contenido de azúcar aumenta, por lo que

la relación azúcar/ácidos aumenta también (Albertini *et al.*, 2006). Las frutas que presentan un sabor dulce notorio, no necesariamente tienen un alto contenido de azúcar, pero generalmente contienen niveles característicamente bajos de ácidos orgánicos (Mikulic *et al.*, 2012). En el caso de los cítricos como naranja y mandarina, esta relación debe de estar mínimo en 7,0-9,1 para que el producto se comercialice en USA, para las uvas esta proporción es mayor y se aceptan para comercializar uvas con valores por encima de 25 y, en el caso de Europa, por encima de 20 (<https://www.yara.cr>). La fruta de *B. guineensis* presenta una relación SST/Acidez de 8,18-8,35 que puede describir el sabor agri dulce que se percibe al consumir esta fruta, similar al de los cítricos.

En lo que respecta al contenido de vitaminas hidrosolubles, solamente se analizó el contenido de vitamina C por medio de cromatografía líquida se identificó y cuantificó el contenido presente en el huiscoyol. Esta vitamina hidrosoluble posee como especies activas el ácido ascórbico (1), el cual puede oxidarse a ácido dehidroascórbico (3) a través del intermediario radical ácido semidehidroascórbico (2), como se observa en la Figura 15.

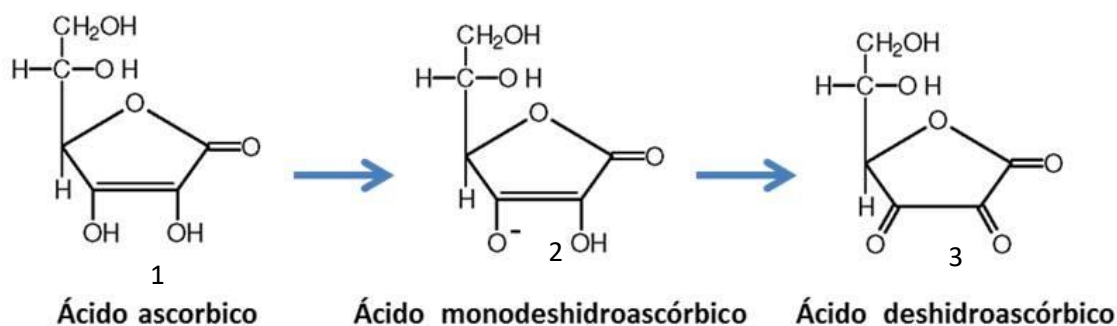


Figura 15. Especies activas de la vitamina C y su equilibrio óxidoreductivo.

Las tres formas (ácido ascórbico, ácido semidehidroascórbico y ácido dehidroascórbico) componen un sistema redox reversible, haciendo que la vitamina C se comporte como inhibidor efectivo de radicales libres y se ha demostrado que es un antioxidante eficaz. Puede actuar tanto directamente, por reacción con radicales peroxilo acuosos, como indirectamente, restaurando las propiedades antioxidantes de la vitamina E liposoluble; lo que trae consigo un control de la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Además, ha sido demostrada en muchos experimentos *in vitro* que es capaz de disminuir el ataque intracelular de radicales libres (Padayatty *et al.*, 2003).

El método analítico para la cuantificación de la vitamina C consistió en la extracción del ácido ascórbico (AA) de la fruta y la reducción del ácido dehidroascórbico (DHA). Se cuantificó el AA y el AA total (considerando el producto de la reducción del DHA); éste último valor es el que corresponde a la vitamina C total. En el caso del huiscoyol, la mayoría de los extractos acuosos de los seis lotes analizados no presentaron ácido ascórbico, como se observa en el cromatograma de la Figura 16a. Luego de la reducción solo los lotes del 2014 presentaron una señal, correspondiente a los valores de 31,5 mg/100 g y 48 mg/100 g de vitamina C total, como se observa en le Figura 16b.

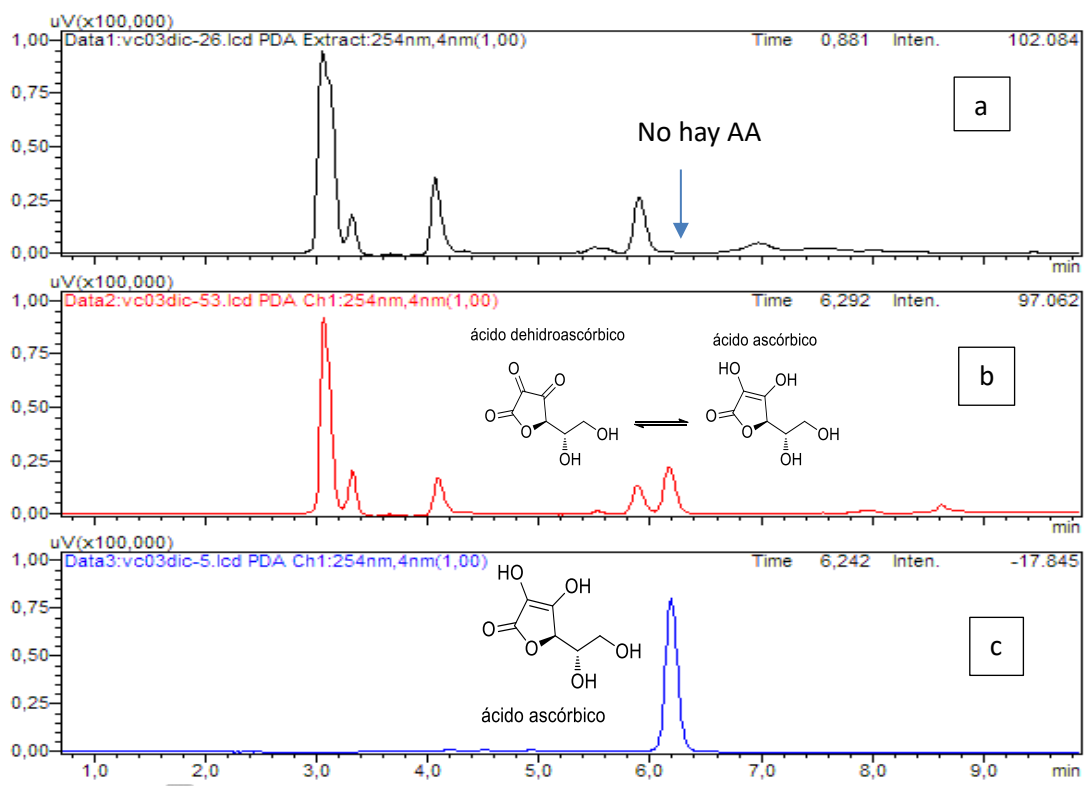


Figura 16. Cromatograma de identificación y cuantificación de vitamina C en a) un extracto de huiscoyol, b) extracto de huiscoyol reducido y c) estándar de AA. Analizado por HPLC-DAD a 254 nm, 0,8 ml/min, 30 °C, H₂SO₄ 18mM.

La acerola que posee un promedio de 1 678 mg /100 g, es la fruta con el contenido de vitamina C más alto reportado por el INCAP, seguido del cas (240 mg/100 g); el huiscoyol se puede comparar con la piña (56 mg/100 g), la naranja dulce (53 mg / 100 g) y el limón (26 mg/100 g), entre otros. Un fruto que pertenece a la misma familia del huiscoyol es el “tucum-do-cerrado” o *tucum amarelo* o *coco de Natal* (*Bactris setosa* Mart.), una fruta nativa de Brasil, que presenta un mayor contenido de vitamina C, 100 mg/100 g de materia fresca (Rosa *et al.*, 2016).

5.1.3 Compuestos polifenólicos presentes en el fruto de huiscoyol

Con respecto al contenido de polifenoles totales, el huiscoyol que se cultiva en Costa Rica presentó valores entre 219,30 – 1 013, 13 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/ 100 g de fruta fresca. Son valores bajos comparados a los reportados en el fruto *Bactris setosa* “tucum-do-cerrado”, el cual presentó un rango de 1 123-1 181 de equivalentes de ácido gálico /100 g de fruto fresco (Rosa *et al.*, 2016). Además, el contenido de polifenoles totales determinado en el huiscoyol es comparable a frutos con alto contenido de polifenoles como las bayas, entre las que se encuentran los arándanos con un contenido de 181–585 mg equivalentes de ácido gálico /100 g, las zarzamoras de 361–555 mg equivalentes de ácido gálico /100 g, las fresas de 102–443 mg equivalentes de ácido gálico /100 g y las frambruesas con 114-517 mg equivalentes de ácido gálico /100 g (Szajdek *et al.*, 2008).

En la investigación de Rufino *et al.* (2010), se clasifican las frutas estudiadas de acuerdo con su contenido de polifenoles en: 1/ contenido bajo para aquellos con valores menores < 100 mg GAE/100 g, 2/ contenido medio correspondiente a 100–500 mg GAE/100 g, y 3/ contenido alto para las frutas que presentan valores superiores a 500 mg GAE/100 g; por tanto, el fruto de huiscoyol se encuentra dentro de esta última categoría.

Algunos estudios atribuyen el color particular del huiscoyol a la presencia de compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de las antocianinas. De acuerdo con Osorio y colaboradores (2010), la variedad de huiscoyol cultivada en Colombia presenta como componentes principales la cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido en un 72,2 % y 15,7 %, respectivamente, y, además, pequeñas cantidades de peonidina-3-rutinósido (5,1 %).

En el caso del fruto que se cultiva en Costa Rica, la cantidad de antocianinas totales se encuentra en el rango de los 28,3-47,9 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g; este valor es muy parecido al que presentan las cerezas 19,0-49,1 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g, siendo la cianidina-3-glucosilrutinosido la mayoritaria; en el caso de la frambuesa los valores están entre 35-40 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g, siendo la cianidina-3-soforósido,

la cianidina-3-glucosilrutinosido y la cianidina-3-glucósido las mayoritarias (Castañeda *et al.*, 2015). Las zarzamoras oscuras (moradas) poseen un contenido alto de antocianinas, de aproximadamente 200 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g, mientras que las zarzamoras rojas poseen menos de 60 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100g (Torre & Barri, 2006). Con respecto al *Bactris setosa* (“tucum-do-cerrado”) el contenido de antocianinas es bajo, este fruto reporta en promedio 83,2 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g (Rosa *et al.*, 2016).

Con respecto al análisis realizado por Osorio *et al.*, en el 2010, el contenido de antocianinas reportado es de 80 ± 10 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g; lo cual representa el doble de lo que se determinó en el huiscoyol analizado en este trabajo. Esto posiblemente se deba al estado de maduración en el cual se encontraban los lotes analizados, o a factores climáticos ya mencionados que se presentaron durante el periodo de cosecha.

Al obtener un extracto acuoso rico en polifenoles e inyectarlo en el cromatógrafo HPLC-DAD a una longitud de onda de 512 nm, se pudo observar una señal mayoritaria en aproximadamente 14,88 min correspondiente a un compuesto de la familia de las antocianinas. Se inyectó el estándar de cianidina-3-O-glucósido (13,91 min) y se observó que no coincidía el tiempo de retención con la señal presente en el extracto, como lo muestra la Figura 17.

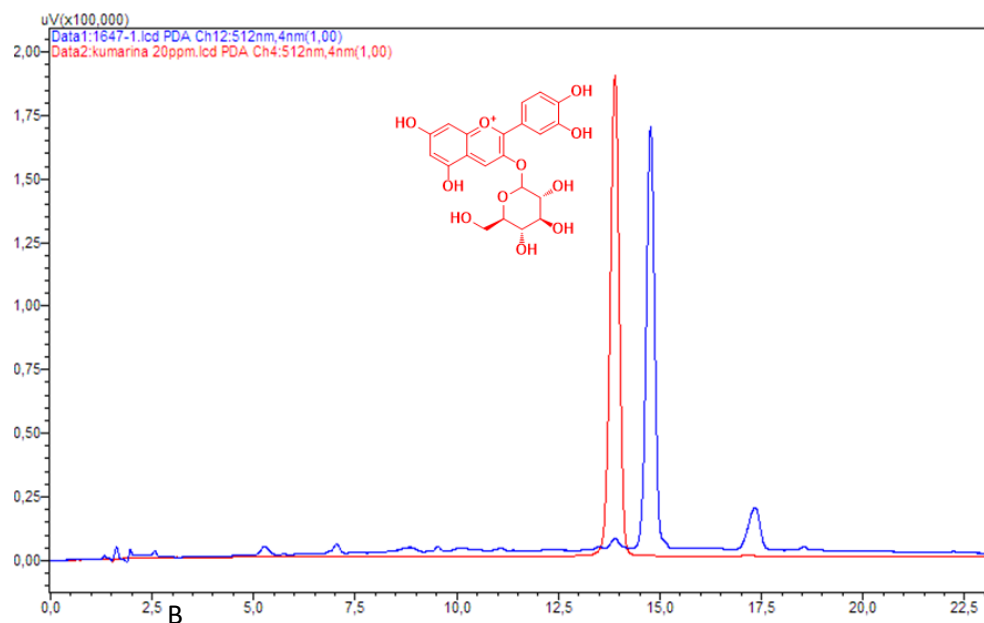


Figura 17. Cromatograma del estándar de cianidina-3-O-glucósido 10 ppm (rojo) y un extracto de huiscoyol (azul) analizado por HPLC-DAD a 512 nm, C18, 0,3 mL/min 35 °C, Fase A: HOCOOH 2%, Fase B ACN:H₂O 80:20.

Se volvió a inyectar otro estándar de antocianina, en este caso la cianidina-3-O-rutinósido y éste eluye a un tiempo de 14,22 min, el cual se encuentra muy cercano a la señal que aparece en el extracto de huiscoyol analizado, por lo que tentativamente puede identificarse que la antocianina mayoritaria presente en el fruto *B. guinnessis* corresponde a la cianidina-3-O-rutinósido.

Con el fin de conocer de manera más precisa la identidad de los compuestos polifenólicos presentes en el fruto de huiscoyol se decidió realizar el análisis utilizando la técnica UPLC-MS. Para ello se obtuvo un extracto concentrado de polifenoles del fruto, el cual se inyectó en el equipo y se analizó tanto en modo negativo como positivo, con el fin de obtener una mayor cantidad de información sobre los compuestos presentes. Se obtuvieron los cromatogramas que se observan en la Figura 18 a y b.

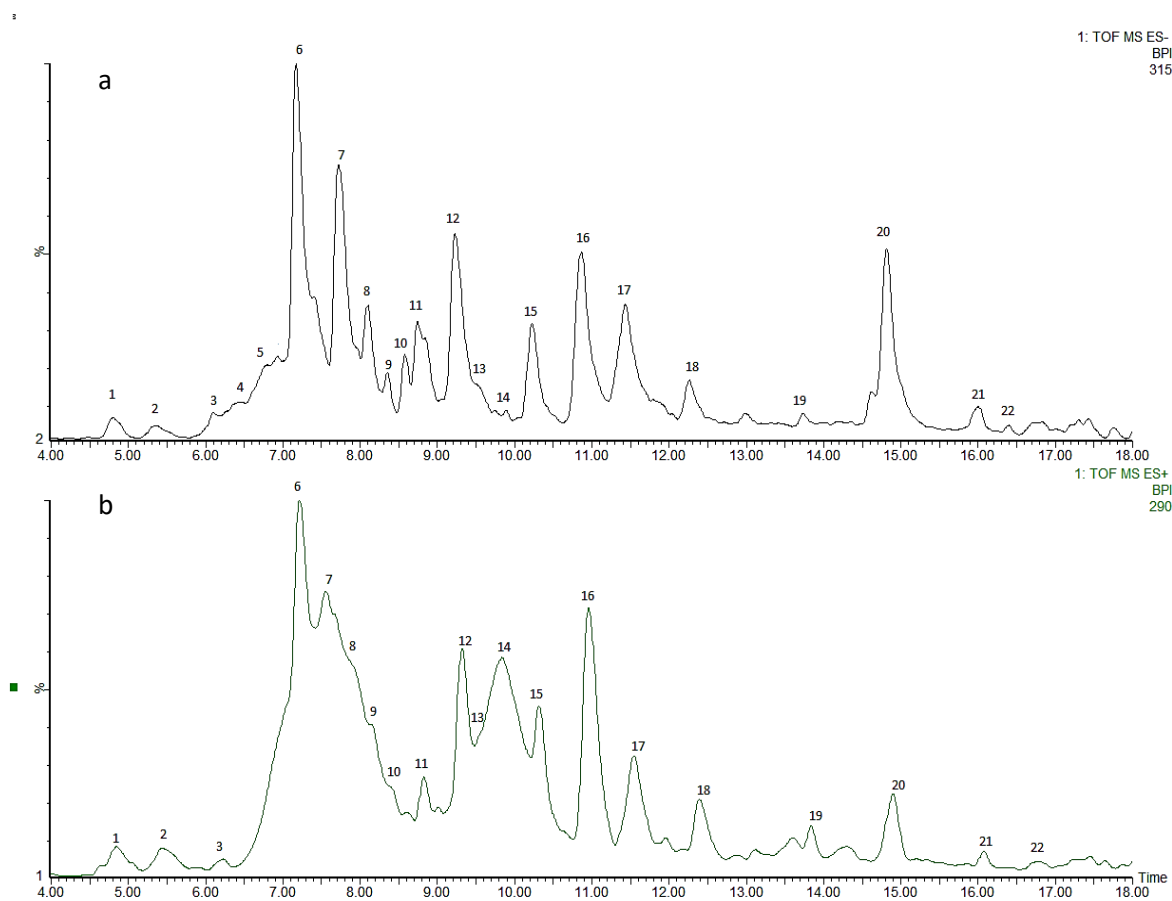


Figura 18. Perfil de compuestos polifenólicos presentes en un extracto de fruta fresca de huiscoyol separados por UPLC-MS A) en modo positivo y B) modo negativo.

De cada señal se extrajo información tanto del ion molecular como del patrón de fraccionamiento en ambos modos, negativo y positivo (Cuadro 5). Se realizó el análisis en ambos modos ya que, por la naturaleza tan variada de los polifenoles, es posible que algunos ionicen de mejor manera en un modo que en otro, debido a los grupos funcionales presentes y las condiciones de análisis. En el caso del extracto de huiscoyol en modo negativo (Figura 18 a) se resuelven mejor las señales que en modo positivo (Figura 18 b), donde se observa un ensachamiento de las mismas y una baja resolución entre ellas.

Cuadro 5. Principales señales de posibles compuestos polifenólicos presentes en un extracto acuoso de la fruta fresca de huiscoyol analizados mediante UPLC-MS, ion molecular y su patrón de fraccionamiento, tanto en modo negativo como positivo.

Pico	TR (min)	UV (nm)	Modo negativo		Modo positivo	
			[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS ⁻ (m/z)	[M-H] ⁺ (m/z)	MS/MS ⁺ (m/z)
1	5,00	210, 280	773,2321	593,1676	757,2246	595,1691
				447,1128		449,1023
				285,0567		287,0529
2	5,78	210, 280	773,2410	611,1833	757,2249	595,1721
				447,1050		449,1237
				285,0491		287,0562
3	6,26	210, 280	881,2427	669,2218	883,1874	575,1201
				613,1962		423,0700
						329,0600
4	6,42	210, 280	609,1265	475,1626	-	287,0542
				287,0769		
5	6,80	210, 280	609,1265	475,1703	-	
				283,0354		
6	7,21	ND	593,1656	577,1477	-	
				407,0791		
				289,0732		
7	7,78	210, 280	865,2147		-	449,1079
				695,3187		287,0492
				577,1353		
8	8,15	210, 280	1153,2466	407,0745	-	
				865,1904		
				575,1168		
9	8,39	210, 280	577,1481	287,0698	-	
				451,1025		
				407,0765		
10	8,65	210, 280	611,1757	289,0698	-	
				475,1430		
				285,0401		
11	8,89	210, 280	865,2188		867,2231	697,1585
				-		579,1547
						409,0903

						274,0582
12	9,40	210, 280	577,1425	407,0913 289,0807	579,1500	409,0894 287,0534
13	9,63	210, 280	-		1155,2938	867,2222 633,1849 325,0674

Continuación del Cuadro 5

Pico	TR (min)	UV (nm)	Modo negativo		Modo positivo	
			[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS ⁻ (m/z)	[M-H] ⁺ (m/z)	MS/MS ⁺ (m/z)
14	9,90	210, 280	1153,2817	593,1597 865,2081 473,1233 353,0908 284,0422	-	
15	10,30	210, 280	1153,2787	593,1596 651,2029 865,2120 284,049	1155,2936	633,1846 595,1684 867,2208 579,1601 409,0587 247,0563
16	10,99	210, 280	1153,2787	593,1596 651,2029 865,2120 284,049	595,165	287,0511
17	11,60	210, 280	865,2189	695,1581 577,1503 407,0885 289,0803	867,2219	579,1505 409,0884 247,0574
18	12,47	210, 280	1153,2214	865,1824 575,1300 407,0879 287,0638	1155,2927	867,2215 579,1512 409,0918 289,0705 247,055
19	13,93	210, 280		- -	1155,2922	867,2192 606,1819 579,1531
20	14,90	210, 280	609,1537	300,0303	-	
21	15,90	210, 280	623,1772	315,0602	-	
22	16,11	210, 280		-	1155,2922	867,2192 579,1531 287,0566

Nota: TR, tiempo de retención

Las señales 1 y 2 según sus características espectroscópicas y patrón de fragmentación podrían indicar la presencia de derivados glucosidados del kaempferol. Se observa el fragmento m/z 287 en modo positivo y m/z 285 en negativo correspondiente a una unidad de kaempferol, éste podría estar glicosidado en la posición 3', 7 o 4, como lo muestra la Figura 19.

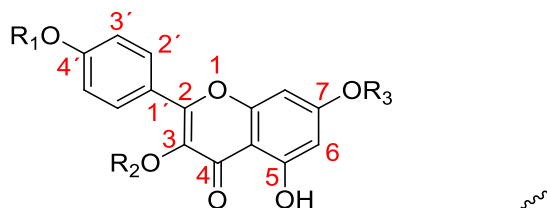


Figura 19 . Estructura de un derivado de kaempferol cuyos R1, R2 o R3 son las posiciones que pueden ser glicosidada.

El patrón de fragmentación de las señales 1 y 2, en modo positivo, muestra una pérdida de una hexosa m/z 595 $[M - 162]^+$ y de un disacárido m/z 449 $[M - 308]^+$ como lo muestra la Figura 20.

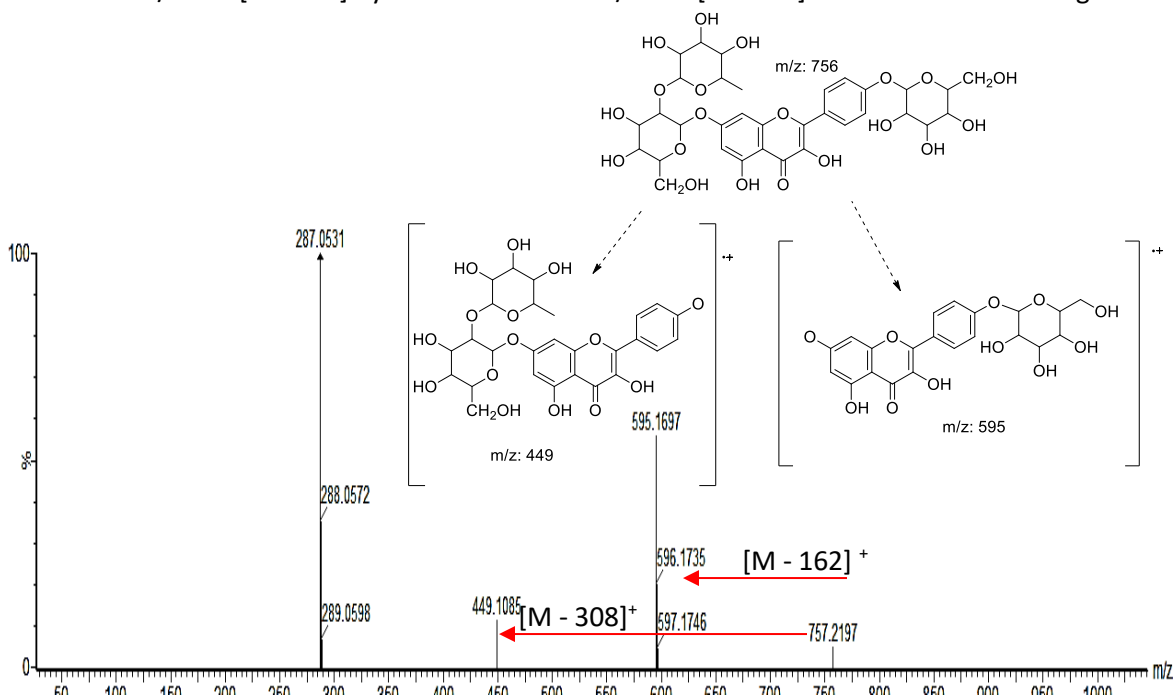


Figura 20. Patrón de fragmentación de la señal 1 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyal por UPLC-MS en modo positivo.

Dicho fraccionamiento es muy parecido al que se presenta en derivados glucosidados del kaempferol, elucidados por Olsen y colaboradores en el 2009 en un extracto de col rizada ("kale"), quienes para un ion molecular de 771 $[M-H]^-$ y 773 $[M-H]^+$ y con iones de 611, 449 y 285 indicaron que correspondía a kaempferol-3-diglucósido-7-glucósido. Por otra parte, Koley y colaboradores en el 2017 realizaron la caracterización de un rábano tropical color morado (*Raphanus sativus*)

proveniente de África, éste presentaba dos compuestos con iones moleculares de m/z : 757,2190 y m/z : 757,1996, los cuales fueron identificados tentativamente como kaempferol-3-O-glucosil-rhamnosil-glucósido y kaempferol-3-O-p-cumaroil-diglucósido y su patrón de fraccionamiento fue de 287,05501 (100%), 433,11292 (11%), 595,16575 (3%) y 163,03879 (100%), 325,9237 (18%), 307,08137 (10%), respectivamente. Con esto se puede plantear la posibilidad de que las señales 1 y 2 presentes en el huiscoyol sean tentativamente derivados glicosidados de la misma naturaleza que los encontrados por dichas investigaciones.

Un grupo importante de compuestos que podrían estar presentes en el huiscoyol son los flavon-3-oles (Figura 21 A, B y C). En el extracto de huiscoyol se encontró que dichos compuestos podrían corresponder a procianidinas diméricas (señales 6, 9, 12), triméricas (señales 7, 11,17) y tetráméricas (señales 8, 11, 13, 14, 15,16, 18 y 22). Esto concuerda con lo encontrado en el fruto *Bactris setosa* (“tucum-do-cerrado”), de acuerdo con Rosa *et al.* (2016).

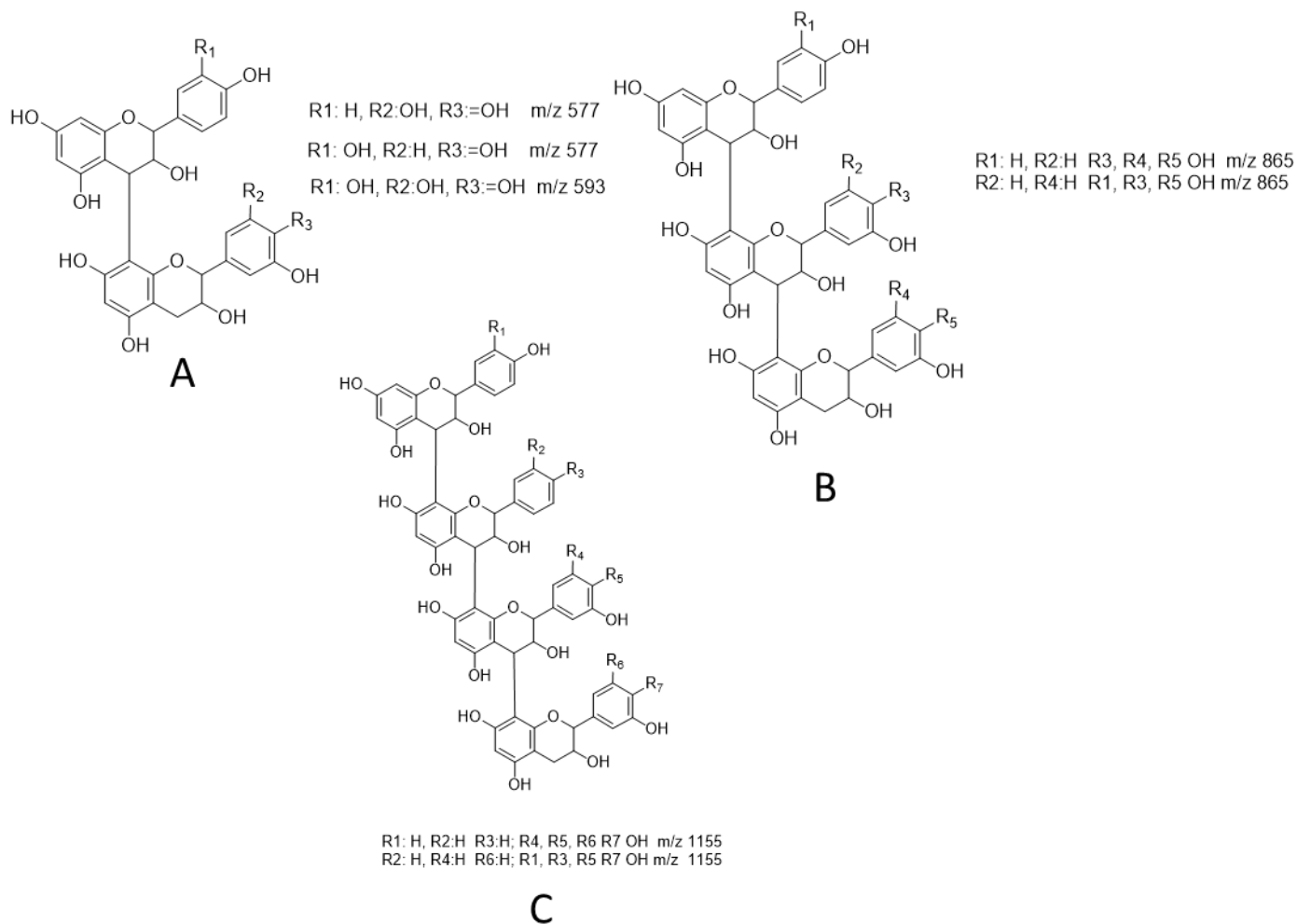


Figura 21. Estructuras de procianidinas A) diméricas, B) triméricas y C) tetraméricas con sus posibles iones en modo negativo.

Las señales 9 y 12 presentan iones de 577 $[M-H]^-$ y 579 $[M+H]^+$ fragmentos $[M - 170]^+$ y $[M - 292]^+$ como se observa en la Figura 22. Dicho patrón podría coincidir tentativamente con el que presenta la procianidina B2 (dímero), según publicaciones en donde se elucidan compuestos similares como en los trabajos realizados por Lazarus *et al.* (1999), Kammerer *et al.* (2004), Ek *et al.* (2006) y Kajdžanoska *et al.* (2010).

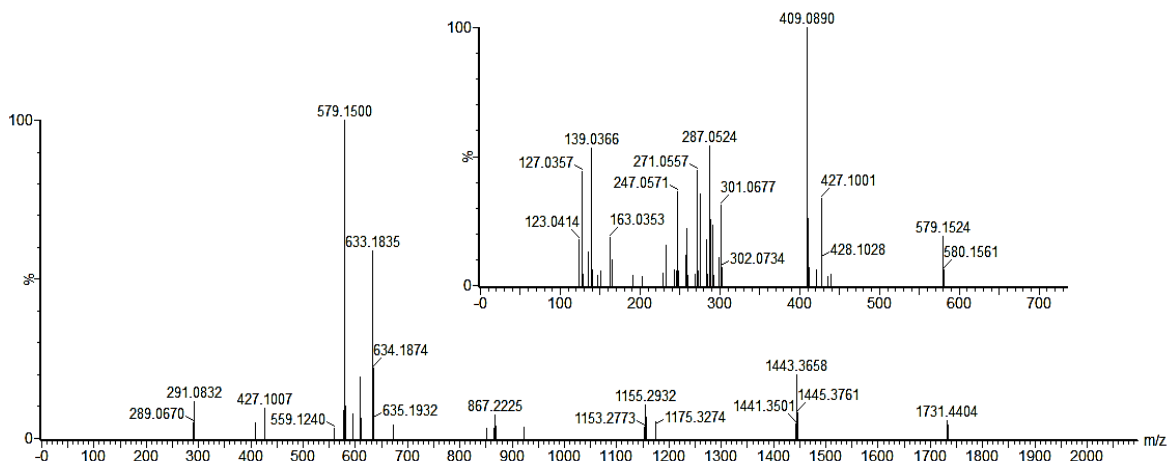


Figura 22. Patrón de fragmentación de la señal 12 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo positivo.

Cuando se analizó el modo positivo, la señal 6 presentó en el espectro de absorción un máximo a 518 nm, un $[M+H]^+$ de 595,1574, con un fraccionamiento de $[M - 146]^+$ (m/z 449) y $[M - 308]^+$ (m/z 287), como se observa en la Figura 23.

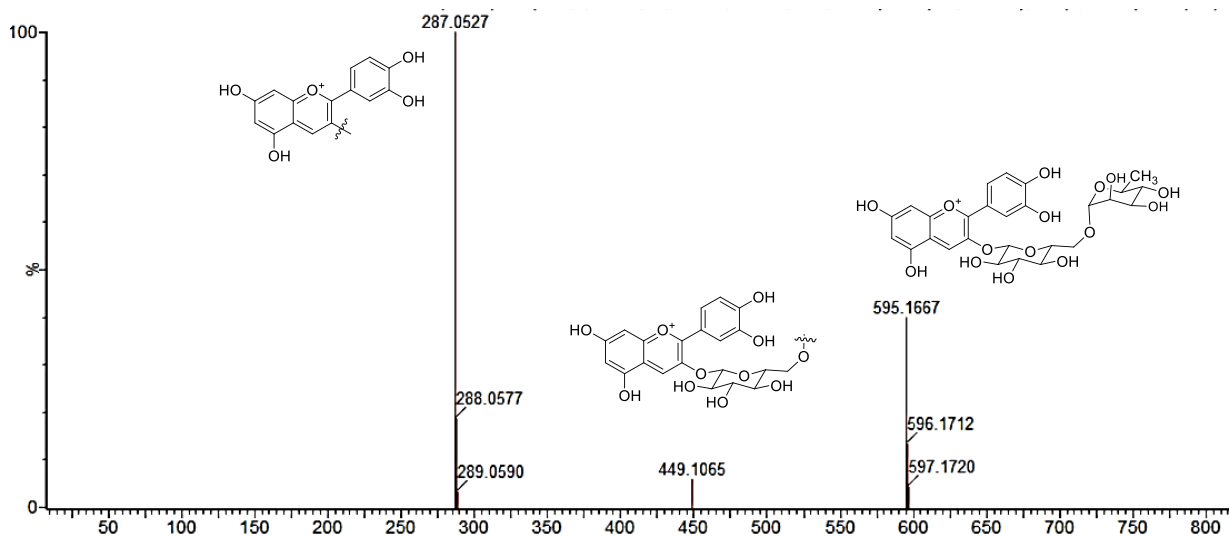


Figura 23. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento del pico correspondiente a la antocianina presente en el extracto de huiscoyol.

Con base en esta información, se puede corroborar que la única antocianina presente en el fruto que se cultiva en Costa Rica corresponde a la cianidina-3-rutinósido. El fragmento 449 m/z corresponde a la pérdida de una hexosa y el fragmento 287 m/z se genera por la pérdida de un disacárido (Garzon *et al.*, 2009). Este patrón de fraccionamiento se puede corroborar con publicaciones anteriores, tales como las realizadas por De Brito *et al.*, en el 2007, quienes

evidenciaron la presencia de esta antocianina en un fruto tropical, “jussara” o palmito dulce (*Euterpe edulis*). Además, un grupo de investigadores de Finlandia en el 2003, a la hora de estudiar el perfil de antocianinas en ciertas variedades de bayas, encontraron en grosella negra (*Ribes nigrum*) o “blackcurrant” en inglés, ese mismo patrón y se lo atribuyen a la cianidina-3-rutinósido (Kahkonen *et al.*, 2003), resultado similar al de la caracterización en zarzamoras hecha por Mertz y colaboradores (2007).

En el caso de la señal 6, en modo negativo, en el mismo tiempo de retención que la antocianina se encuentra un derivado dimérico de la catequina (Figura 24), y es posible que corresponda a epigallocatequina-catequina a partir de su ion molecular y patrón de fraccionamiento, de acuerdo con lo reportado por Li y Deinzer (2007).

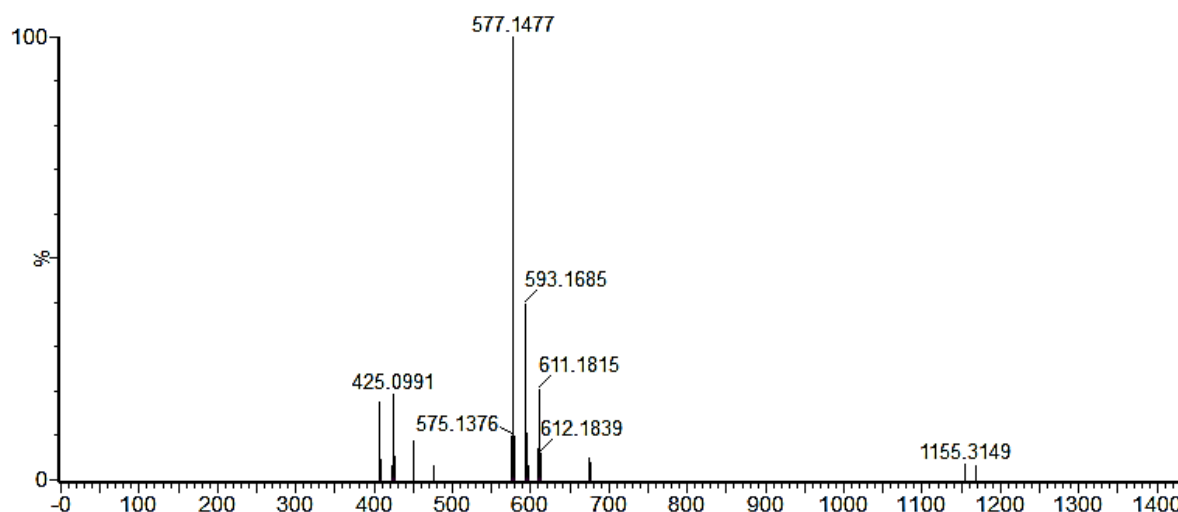


Figura 24. Patrón de fragmentación de la señal 6 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo negativo.

En el extracto de huiscoyol también se pudo encontrar tetrámeros de procianidinas como se observa en la Figura 25. Según lo reportado por Lazarus *et al.* (1999), Li y Deinzer (2007), y Kajdžanoska *et al.* (2010), las señales que presentan ion padre de 1155 $[M+H]^+$ y 1153 $[M-H]^-$ y fragmentos como 867, 579, 287 en positivo y 865, 593, 285 en negativo corresponden a tetrámeros de procianidinas que posiblemente sean polímeros de catequina o epicatequina.

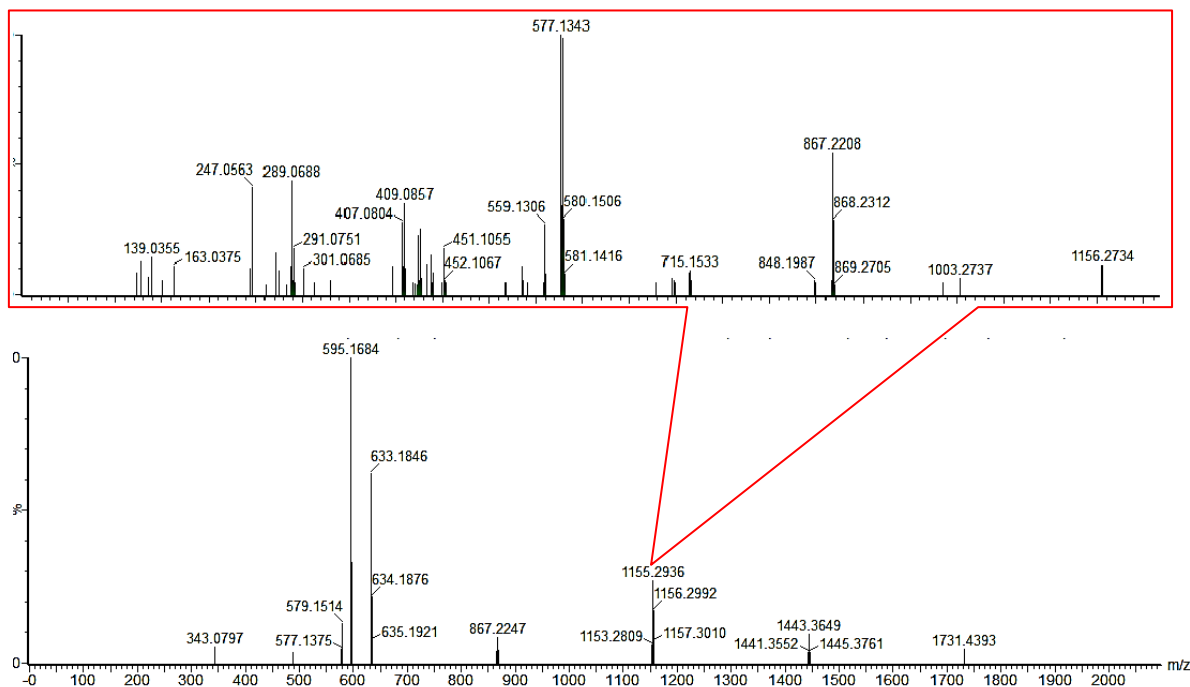


Figura 25. Patrón de fragmentación de la señal 8 del perfil de compuestos polifenólicos del extracto de huiscoyol por UPLC-MS en modo positivo.

Las señales 3, 4, 5, 10, 20 y 21 son compuestos que no se pudieron identificar ya que hace falta una mayor cantidad de experimentos de fragmentación para tratar de elucidar su identidad.

5.1.4 Capacidad antioxidante por el método ORAC

En lo que respecta a la actividad antioxidante del huiscoyol, solamente se encuentra un estudio publicado en el 2011 por Osorio y colaboradores, quienes analizaron la capacidad antioxidante de un extracto rico en antocianinas aisladas del fruto utilizando las técnicas de DDPH y ABTS. Estos autores concluyeron que el *Bactris guineensis* es un fruto con una alta capacidad antioxidante, que es mucho más activo contra radicales de DDPH que contra los ABTS, ya que con los primeros la velocidad de reacción es mucho mayor. Estos dos métodos de análisis se basan en la medición de la actividad antioxidante mediante el mecanismo de transferencia de electrones.

Existe otro método que se basa en la medición de la capacidad que posee un antioxidante de secuestrar radicales libres por medio de la donación de protones (Prior *et al.*, 2005). En este caso se transfiere el protón del agente antioxidante al radical $\text{ROO}\bullet$, el cual se convierte en una especie neutra y el radical formado en el agente oxidante es estabilizado por deslocalización (Apak *et al.*,

2011; Naczk & Shahidi, 2003). ORAC es uno de estos métodos, el cual puede ser hidrofílico o lipofílico dependiendo del tipo de solvente que se utilice para la extracción. Este método lo que determina es la capacidad antioxidante siguiendo la cinética de una reacción por medio de un espectrofluorómetro. En principio, se tiene una disolución de fluoresceína que cuando está en contacto con radicales libres, muestra una disminución de la intensidad de la señal de fluorescencia; si en la muestra a analizar existen compuestos antioxidantes, éstos contrarrestan el ataque de los radicales libres, protegiendo así la disolución de fluoresceína.

En el caso de la presente investigación, se utilizó el método ORAC hidrofílico; el fruto de huiscoyol se extrajo con una mezcla de acetona: agua, el extracto acuoso se pone a reaccionar con la fluoresceína y se determina la actividad antioxidante. Los valores obtenidos se ubican en un rango de 326-561 μmol de equivalentes de Trolox (TE) / g de muestra seca. La actividad antioxidante del huiscoyol se encuentra entre los valores más altos, en comparación con otras frutas como las moras (400 μmol TE / g de muestra seca), arándano (412 μmol TE / g muestra seca), uvas (64,28 μmol TE / g muestra seca) o frambuesa (328 μmol TE / g muestra seca), por lo que de acuerdo con Wu *et al.*, (2004 a, b), el huiscoyol se puede considerar dentro de las frutas con mayor capacidad antioxidante.

5.2 Efecto del procesamiento del jugo de huiscoyol sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante por el método ORAC

5.2.1 Generalidades del procesamiento del huiscoyol: rendimientos y características fisicoquímicas del jugo

Una vez caracterizado el fruto de huiscoyol se puede concluir que, al poseer características fisicoquímicas relevantes como: color, acidez titulable, fibra dietética, carbohidratos totales, contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante, es una excelente materia prima para la elaboración de productos comerciales, entre ellos jugos, mermeladas o bebidas alcohólicas, como se ha visto en otros países (Garguillo *et al.*, 2008). Tradicionalmente en Costa Rica se consume como fruta fresca o en jugo, por lo que para esta investigación se consideró únicamente el procesamiento de esta fruta para la obtención de un jugo.

Para el procesamiento de la fruta se consideraron operaciones unitarias como el prensado de la pulpa, un tratamiento enzimático de la pulpa previo al prensado con el fin de propiciar una

mayor extracción de jugo y, por último, un tratamiento térmico para ampliar la vida útil de producto. Se evaluó el impacto de estas operaciones en el contenido de compuestos bioactivos tales como polifenoles, antocianinas y vitamina C total, así como en la actividad antioxidante determinada por el método ORAC.

Como se mencionó en el apartado de metodología, la materia prima proviene principalmente de la provincia de Guanacaste, de la zona de Cañas; este fruto crece de manera silvestre a lo largo de pantanos, ríos y caminos, por lo que se coordinó la recolección de varias muestras durante el año 2016 en los periodos en los que se observara una mayor producción del fruto, en febrero-mayo y agosto-octubre. Se recolectó una cantidad de aproximadamente 30 kg de frutos, los cuales se cosecharon en racimos, por lo que para procesar primero se separaron de manera manual cada uno de los frutos del racimo, se colocaron en un recipiente de acero inoxidable y se descartaron los frutos que no cumplían con características de integridad física, como color y textura, por ejemplo aquellos que estaban verdes, secos, arrugados o que se encontraban en descomposición. Se eliminaron agentes físicos como ramas y piedras.

Después de la selección se enjuagó la fruta con abundante agua con el fin de eliminar rastros de tierra, residuos de animales, fertilizantes; este proceso se realizó tres veces. Luego se preparó una disolución desinfectante a base de ácidos peracéticos y peroctanoicos para reducir la carga microbiana en la cáscara de los frutos, se sumergió la fruta en esta disolución por 20 min, se decantó y se dejó escurrir la fruta, se hizo un último lavado con agua y se dejó secar.

La muestra compuesta de huiscoyol se dividió en tres partes iguales en masa que se rotularon como muestra 1 (M1), muestra 2 (M2) y muestra 3 (M3), con el fin de procesarse en diferentes días según el diagrama de la Figura 12 y se determinó el rendimiento de cada operación, así como su efecto en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante de fruta.

Para separar la semilla del fruto se empleó una despulpadora provista de una malla con un tamaño de abertura de 0,125 pulgadas, esto debido al tamaño del fruto y el espesor de la cáscara. Como mencionaron Galeano y colaboradores (2010), la parte comestible de la fruta corresponde a la pulpa y la cáscara fina, y representa un 66 % del fruto. El rendimiento promedio de esta primera etapa fue de un 65 %, el cual está acorde con lo reportado en la literatura (Cuadro 6).

Cuadro 6. Rendimiento de despulpado de la fruta de huiscoyol a escala piloto.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Fruta fresca (kg)	11,92	10,04	9,32
Despulpado			
Pulpa (kg)	8,17	6,19	6,06
Residuo (kg)	3,19	3,22	2,99
Total (kg)	11,36	9,41	9,05
Rendimiento de obtención de pulpa	68,5 %	61,6 %	65,0 %
Prensado			
Masa inicial (kg)	5,00	4,70	4,51
Jugo (kg)	2,51	2,28	2,13
Residuo (kg)	2,43	2,30	2,33
Rendimiento de obtención de jugo prensado	50,20 %	48,5 %	47,2 %
Tratamiento enzimático acoplado a un prensado			
Masa inicial (kg)	6,31	4,71	4,52
Jugo (kg)	3,33	2,37	2,47
Residuo (kg)	2,92	2,33	1,97
Rendimiento de obtención de jugo prensado macerado enzimáticamente	52,7 %	50,3 %	54,6 %

Como se observa en la Figura 26b, queda materia adherida a la semilla por lo que se opta por combinar ambas masas (tanto la pulpa como la semilla) y realizar en este combinado el prensado y el tratamiento enzimático, para así aumentar el rendimiento de ambas operaciones, además de extraer de una mayor cantidad de compuestos bioactivos.

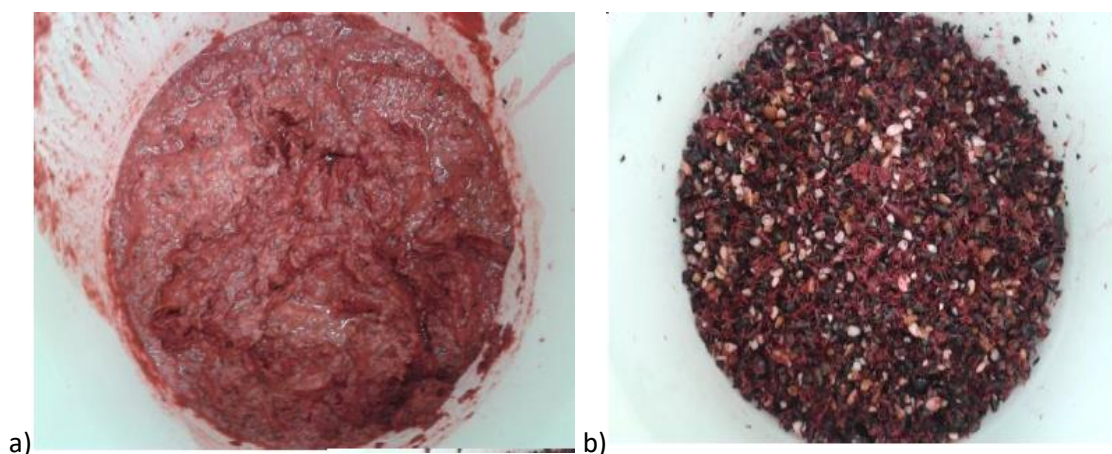


Figura 26. a) Pulpa y b) residuo del despulpado de huiscoyol.

Con el prensado de la fruta se obtuvo un jugo con una coloración rojo intensa, como se observa en la Figura 27, con un rendimiento promedio de 48,6 %.



Figura 27. Prensado de la pulpa de huiacoyol y obtención del jugo.

Según la literatura, el uso de enzimas en el procesamiento de frutas y vegetales contribuye a aumentar el rendimiento y la producción de varios tipos de jugos, siendo uno de los principales objetivos de la industria de los jugos obtener mayores rendimientos en sus productos a un bajo costo (Wang *et al.*, 2008).

Usualmente la adición de pectinasas permite degradar las sustancias pécticas en la pared celular de productos de origen vegetal, lográndose una licuefacción parcial o total de la pulpa de fruta, lo que genera un aumento en el rendimiento de producción de pulpas, jugos y néctares de frutas (Baumann, 1981). Además, la maceración enzimática mejora la extracción de otros componentes de la fruta responsables del color, el sabor y de compuestos bioactivos, así como minimiza los impactos de ciertos compuestos en características como la turbidez o la viscosidad y, en algunos casos, logra eliminar compuestos que generan el amargor en el producto final (Ribeiro *et al.*, 2010).

Bajo esta premisa se realizó un tratamiento enzimático a la masa de pulpa y residuo mediante el uso del producto comercial Pectinex Ultra SP (Novozymes, Dinamarca), el cual, según sus especificaciones, es un conjunto pectonilítico altamente activo, producido por una cepa seleccionada de *Aspergillus aculeatus* que posee actividades pectonilítica y hemicelulolítica, capaz de degradar compuestos de las paredes celulares de las plantas como las pectinas, celulosas, hemicelulosas y lignina. La enzima activa de dicho producto es la poligalacturonasa, la cual cataliza la hidrólisis de los enlaces α (1,4)-glicosídico en el ácido poligalacturónico (Tapre y Jain, 2014). Las condiciones óptimas para la actividad enzimática de Pectinex Ultra SP corresponden a una

temperatura de incubación de (30-50) °C y un rango de pH de 4-9; en este caso, el pH de la masa a macerar se encuentra entre dicho rango y se optó por utilizar una temperatura de (35-40)°C. Primeramente se calentó la masa a macerar y una vez alcanzada la temperatura se añadió una concentración de 250 ppm del preparado enzimático, se agitó por 1 h y luego se procedió a prensar para obtener el jugo.

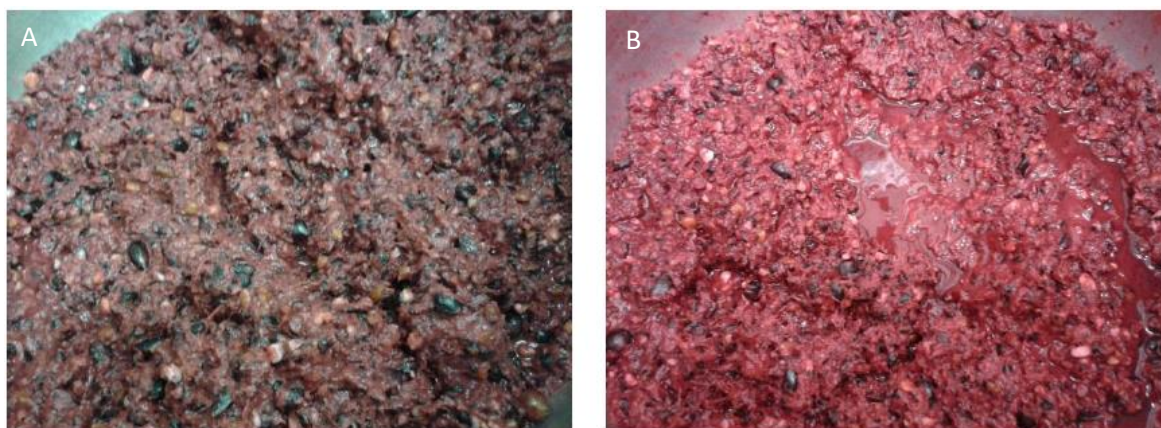


Figura 28. Masa de pulpa de fruta antes (A) y después (B) de la maceración enzimática.

En las tres muestras se encontró un incremento en el porcentaje de extracción de jugo, en promedio el tratamiento enzimático tuvo un rendimiento de $(52,8 \pm 2,5) \%$, lo que equivale aproximadamente a un incremento del 4%, comparado con el rendimiento obtenido solamente con el prensado $(48,6 \pm 1,7) \%$. Es un incremento bajo si se compara con el mejoramiento reportado para manzanas que pasó de un 68 % a un 77 % utilizando preparados enzimáticos ([Oszmianiski et al., 2009](#)) o para jugos de zarzaparrilla cuyo rendimiento aumentó de 66,4 % a 78,9 % cuando se realizó una maceración enzimática de la pulpa ([Landbo & Meyer, 2004](#)). Para mejorar el rendimiento se podrían haber optimizado las condiciones del tratamiento enzimático, aumentando por ejemplo la temperatura de maceración, ya que el preparado enzimático tenía una temperatura máxima de actividad de 50 °C. Aun así, como se muestra en la Figura 27, se dio un cambio en la coloración de la masa antes (Figura 28.A) y después (Figura 28.B) de la aplicación del tratamiento enzimático, lo que muestra que ocurre una extracción de compuestos bioactivos responsables de la coloración, lo que es un objetivo de este tratamiento.

Luego de la maceración enzimática se procedió a aplicar tanto en el jugo A como en el B un tratamiento térmico, esto con el objetivo de reducir la carga microbiana y las alteraciones producidas por dichos microorganismos, y por tanto aumentar la vida útil del producto. Se sabe que en los

productos derivados de frutas con un pH <4, se pueden encontrar bacterias patógenas como *Salmonella* y *Staphylococcus*, así como bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) (Hui, 2006), estas últimas inhiben el crecimiento de patógenos, pero pueden causar deterioro en el producto y cambios en las propiedades sensoriales del producto. Como opción de tratamientos térmicos se encuentran la pasteurización y la esterilización comercial con varios propósitos, el primero de ellos es inactivar enzimas naturales para evitar la disminución de la estabilidad del jugo en lo que respecta a características como color, turbidez y aroma, y además de eliminar microorganismos patógenos y reducir la carga microbiana del jugo a un nivel que permita disminuir el deterioro del jugo, y por ende aumentar su conservación durante su vida comercial (Lorente *et al.*, 2014)

El tipo de tratamiento térmico va a depender del uso y almacenamiento que se aplique al jugo, si se quiere que el producto sea de corta duración o larga duración en anaquel o refrigeración. Para el caso de los jugos de huiscoyol elaborados, éstos poseen un pH alrededor de 2,5 por lo que se puede optar por una pasteurización a 71,1 °C por 3 s según lo estipula Mazzotta, (2001); o bien se puede optar por una esterilización comercial y envasado aséptico como lo estipula Padilla-Zakour (2008) a 85 °C de 2 a 5 s con un llenado en caliente. Como se contaba con una cantidad limitada de material y se quería que el producto presentara una estabilidad en un largo tiempo se escogió la esterilización comercial como tratamiento térmico. Ésta se realizó a escala de laboratorio, en lotes de 500 mL, en beaker de acero inoxidable para favorecer un calentamiento rápido, el jugo se envasó en caliente en botellas de vidrio previamente desinfectadas como se observa en la Figura 29.



Figura 29. Esterilización comercial de los jugos de huiscoyol a escala laboratorio.

Una vez obtenidos los cuatro productos, jugo A (jugo prensado), jugo B (jugo tratado enzimáticamente y prensado), jugo C (jugo prensado y tratado térmicamente) y el jugo D (jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente), se evaluó el efecto de las operaciones unitarias sobre características fisicoquímicas generales tales como humedad, pH, grados Brix y acidez; los resultados se muestran en el Cuadro 7. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las variables de pH, humedad y grados Brix entre muestras, lo que evidencia que existe una alta variabilidad en la composición de los frutos, debido probablemente a los diferentes estados de maduración de los mismos. Lo anterior se intentó solventar mediante un proceso de homogenización de los lotes recolectados, pero los resultados obtenidos muestran que dicha homogenización no fue efectiva.

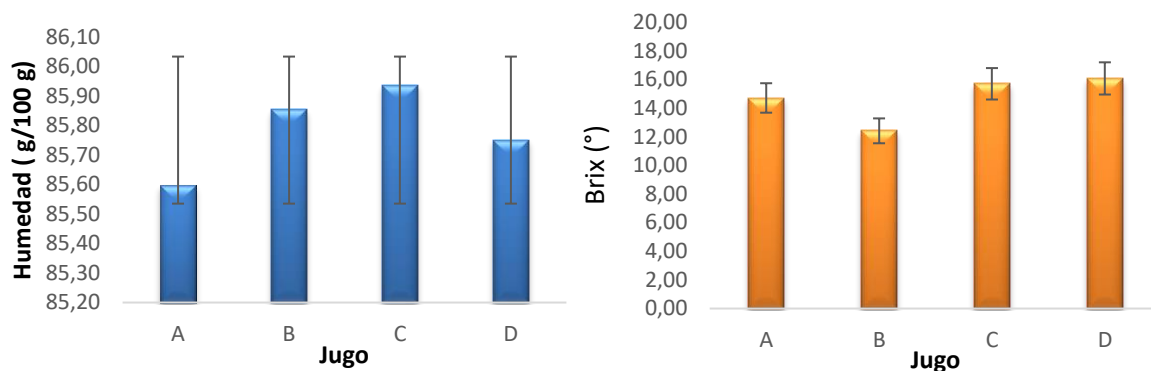
Cuadro 7. Características fisicoquímicas generales (humedad, pH, grados Brix y acidez) de jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), según el lote de producción con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% y resultado de la prueba de comparación de medias de Tukey, con un valor $n=3$ para cada muestra y jugo.

Jugo	Muestra	Humedad (g/100 g)	pH	Acidez titulable (g ácido succínico / 100 g)	Brix (°)
A	M1	83,74 ± 0,03 ^a	2,51 ± 0,01 ^a	4,22 ± 0,20 ^a	14,89 ± 0,01 ^a
	M2	86,00 ± 0,08 ^b	2,45 ± 0,01 ^b	4,26 ± 0,19 ^a	14,91 ± 0,01 ^a
	M3	87,05 ± 0,02 ^c	2,46 ± 0,01 ^b	4,34 ± 0,82 ^a	14,34 ± 0,01 ^b
	Valor p	<0,0001	<0,0001	0,9143	<0,0001
B	M1	84,39 ± 0,02 ^a	2,52 ± 0,01	4,27 ± 0,03 ^a	12,42 ± 0,01 ^a
	M2	86,38 ± 0,04 ^b	2,51 ± 0,01	4,24 ± 0,18 ^a	10,94 ± 0,01 ^b
	M3	86,79 ± 0,01 ^c	2,46 ± 0,01	3,90 ± 0,26 ^a	13,89 ± 0,01 ^c
	Valor p	<0,0001	NC	0,0582	<0,0001
C	M1	84,55 ± 0,01 ^a	2,53 ± 0,01 ^a	4,05 ± 0,16 ^a	16,89 ± 0,01 ^a
	M2	86,39 ± 0,04 ^b	2,49 ± 0,01 ^b	3,77 ± 0,17 ^a	15,33 ± 0,01 ^b
	M3	86,88 ± 0,01 ^c	2,48 ± 0,01 ^b	4,03 ± 0,10 ^a	14,89 ± 0,01 ^c
	Valor p	<0,0001	<0,0002	0,0782	<0,0001
D	M1	83,96 ± 0,03 ^a	2,50 ± 0,01 ^a	4,07 ± 0,17 ^a	17,40 ± 0,01 ^a
	M2	86,20 ± 0,06 ^b	2,42 ± 0,01 ^b	4,20 ± 0,11 ^a	15,95 ± 0,01 ^b
	M3	87,09 ± 0,01 ^c	2,47 ± 0,01 ^c	4,01 ± 0,03 ^a	14,89 ± 0,01 ^c
	Valor p	<0,0001	<0,0001	0,1715	<0,0001

Para un mismo jugo, letras diferentes entre muestras señalan diferencias significativas entre medias.

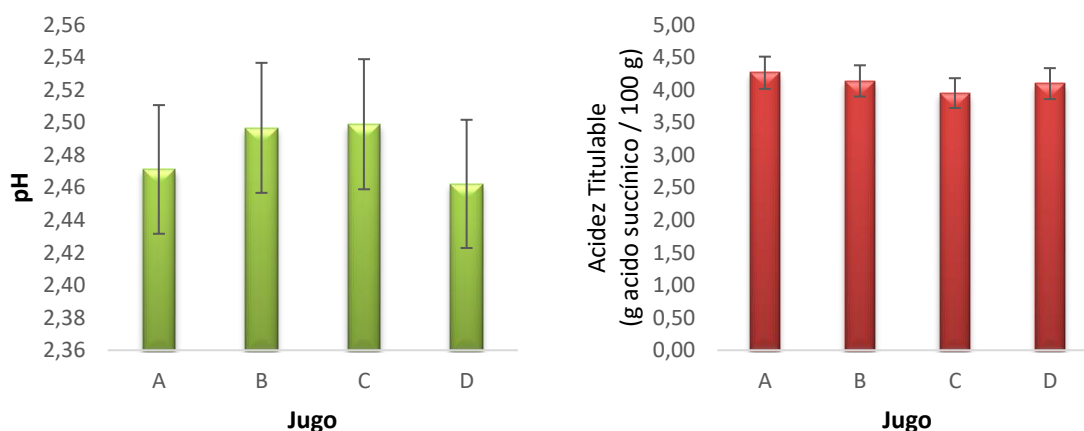
Se opta, por tanto, por realizar el análisis estadístico mediante un diseño factorial, bloqueando el factor “muestra”. Se puede observar en los gráficos de la Figura 30 que, para los valores de humedad (valor de $p = 0,9468$) y la acidez (valor de $p = 0,0825$) no existen diferencias significativas entre los jugos. En el caso del pH cuando se realiza el análisis de ANDEVA se obtiene un valor de p de 0,0281, pero cuando se hace el análisis de Tukey no hay diferencia significativa entre

los jugos. Para los valores de grados Brix sí existe diferencia significativa entre los jugos ($p < 0,05$); el jugo B presenta un valor bajo de sólidos solubles, mientras que el jugo D presenta un valor superior al jugo A, posiblemente por la sinergia de ambos tratamientos, tanto el térmico como el enzimático.



a)

b)



c)

d)

Figura 30. Valores promedio de a) humedad b) grados Brix, c) pH y d) acidez de los diferentes jugos de huiscoyol obtenidos a escala piloto, Jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), $n=3$.

A raíz de que existe una disminución de los sólidos solubles en el jugo B, se procedió a cuantificar los azúcares individuales presentes, así como los ácidos orgánicos con el fin de observar cuál es el origen de las diferencias. Como se observa en el Cuadro 8, no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en los contenidos de los azúcares simples ni en el ácido málico; con respecto al ácido cítrico sí hay diferencias significativas, ya que el jugo C es el que presenta una mayor cantidad de este compuesto. En el caso del ácido succínico el jugo C presenta un valor menor. Es posible que las

diferencias en el jugo B se deban a otros componentes solubles, tal vez a compuestos bioactivos como polifenoles, vitaminas, entre otros.

Cuadro 8. Contenido de azúcares totales y ácidos orgánicos presentes en el jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo.

Jugo	Azúcares (g/100 g)		Ácidos orgánicos (mg/100 g)		
	Glucosa	Fructosa	Ácido cítrico	Ácido málico	Ácido succínico
A	3,54 ± 0,86 ^A	3,46 ± 0,77 ^A	0,17 ± 0,07 ^A	1,21 ± 0,33 ^A	3,09 ± 0,38 ^A
B	3,05 ± 0,57 ^A	3,04 ± 0,55 ^A	0,17 ± 0,09 ^A	1,20 ± 0,40 ^A	2,95 ± 0,30 ^{AB}
C	3,29 ± 0,53 ^A	3,26 ± 0,76 ^A	0,36 ± 0,22 ^B	1,11 ± 0,26 ^A	2,69 ± 0,40 ^B
D	3,50 ± 0,03 ^A	3,54 ± 0,65 ^A	0,20 ± 0,07 ^A	1,10 ± 0,01 ^A	2,96 ± 0,16 ^{AB}
Valor p	0,3496	0,2802	0,0004	0,7651	0,0242

Para una misma columna, promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas.

5.2.2 Efecto de operaciones unitarias del procesamiento de huiscoyol en el contenido de compuestos bioactivos

El huiscoyol es una fruta que posee un contenido compuestos bioactivos alto, en lo que corresponde a polifenoles totales (300-900 mg de equivalentes de ácido gálico/100 g) y antocianinas totales (30-50 mg de equivalentes de cianidin-3-glucósido), lo que conllevó a la necesidad de evaluar el efecto del procesamiento de la fruta para la obtención de jugo sobre este tipo de compuestos. Con el fin de obtener un jugo que sirviera como materia prima para la elaboración de bebidas, incluyendo bebidas alcohólicas, jaleas o mermeladas, en los cuales se mantengan las propiedades funcionales de la fruta.

En el cuadro 9 se resumen los valores obtenidos para el contenido de polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico, el contenido de antocianinas totales expresados como equivalentes de cianidina-3-O-glucósido y el contenido de vitamina C total. Dichas variables son reportadas en el producto fresco según el tipo de producto obtenido.

Cuadro 9. Contenido de polifenoles totales, antocianinas totales y vitamina C presentes en el jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), en base fresca con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo .

Jugo	Polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/ 100 g)	Antocianinas totales (mg equivalentes de cianidina-3- glucósido / 100 g)	Vitamina C Total (mg/100 g)
A	265 ± 14 ^A	18,0 ± 2,5 ^A	13,1 ± 1,9 ^A
B	283 ± 27 ^A	19,7 ± 2,3 ^A	12,5 ± 2,2 ^A
C	242 ± 11 ^A	20,0 ± 1,4 ^A	12,03 ± 0,20 ^A
D	249 ± 52 ^A	23,4 ± 5,4 ^A	11,32 ± 0,16 ^A
Valor p	0,3701	0,6476	0,4733

Para una misma columna, promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas.

5.2.3 Contenido de polifenoles totales

En el caso del contenido de polifenoles totales, los frutos de huiscoyol que son cultivados en Costa Rica presentaron valores entre 219,30 – 1 013, 13 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g de fruta. Los jugos obtenidos por los diferentes tratamientos presentan un contenido de polifenoles entre 242 – 283 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g. Se puede por tanto establecer que el contenido de polifenoles de la fruta se extrae en su mayoría, y se encuentran en el jugo.

Según el Cuadro 9, no existe diferencia significativa en el contenido de polifenoles totales entre el jugo prensado (jugo A) y el jugo obtenido después del tratamiento enzimático (jugo B), por lo que se concluye que esta operación no afecta el contenido de estos compuestos, lo cual es beneficioso ya que es posible utilizar una maceración enzimática para aumentar el rendimiento de extracción de jugo sin afectar significativamente los polifenoles. Es posible que el leve calentamiento a 37 °C que se le aplicó a la pulpa, como parte de la activación del preparado enzimático comercial, sirvió para evitar oxidaciones por parte de enzimas endógenas en el producto.

Al inicio de la investigación se postuló la hipótesis que el tratamiento térmico de esterilización comercial, para matener el jugo en anaquel a temperatura ambiente, afectaría de manera negativa el contenido de polifenoles. Esto basado en varios estudios que explican el efecto sobre frutas como la fresa, arándanos, manzanas, naranjas, de los tratamientos térmicos como

esterilización, pasteurización y deshidratación, los cuales causan la pérdida de compuestos antioxidantes como polifenoles, carotenoides y vitamina C debido a reacciones de Maillard o por degradación oxidativa (Nayak *et al.*, 2015; Ioannou *et al.*, 2012). Como se observa en el cuadro 9, no existe diferencia significativa entre el jugo prensado (Jugo A) con el jugo tratado térmicamente (Jugo C), por lo que se rechaza la hipótesis antes propuesta. Esto se debe, posiblemente, a la naturaleza de los polifenoles presentes en el fruto de huiscoyol, los cuales puede que posean una estructura tal que les permita cierta estabilidad térmica o exista un efecto sinérgico entre ellos. Rojano *et al.*, (2012) observaron que al realizar una infusión del fruto de *Bactris guineensis* con agua a 101 °C se obtenía una mayor cantidad de polifenoles, con respecto a un tratamiento a temperaturas inferiores, lo que podría deberse quizás a que a mayores temperaturas se dé una mejor extracción de los compuestos ligados a la pared celular.

Por último, si se compara el jugo A con el D no hay diferencia significativa, observándose que un tratamiento térmico acoplado a una maceración enzimática no afecta el contenido de polifenoles en el jugo de huiscoyol, por lo que se puede aumentar el rendimiento de producción de un jugo, que puede ser estable a temperatura ambiente, manteniendo sus propiedades funcionales.

5.2.4 Contenido de antocianinas totales

Las antocianinas totales en los frutos analizados presentan valores de entre 28,3-47,9 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g; los jugos obtenidos contienen un valor de antocianinas menor al reportado para la fruta fresca (18,0-23,4 mg equivalentes de cianidin-3-glucósido /100 g), esto porque, posiblemente queden aún en la torta residual después del prensado, correspondiente a la cáscara del fruto y parte de la semilla. Solo el 50 % del contenido mínimo de antocianinas del fruto pasa al jugo de huiscoyol; esta pérdida de antocianinas en el prensado se ha visto en otras frutas tales como arándanos, reportándose que el 15 % del contenido original de antocianinas se queda en la torta (Brownmiller *et al.*, 2008). Otros estudios reportan en arándanos una pérdida de antocianinas de 18% hasta 42 % (Skrede *et al.*, 2000) y de 55 % (Lee *et al.*, 2002) durante el prensado; en el caso de las moras se ha reportado que la pérdida durante el prensado fue de un 20 % (Gancel *et al.*, 2012).

En el Cuadro 9 se observa que no existen diferencias significativas entre el jugo prensado (A) con los jugos obtenidos en cada tratamiento (B, C y D). Esto en contraposición a otros estudios

donde se han reportado que la cantidad de antocianinas y otros compuestos aumenta con la maceración enzimática. Esto porque las enzimas al degradar componentes estructurales de las paredes celulares favorecen la extracción de compuestos bioactivos (Pilnik & Voragen, 1991). Este mismo comportamiento, de incremento en la cantidad de antocianinas, se ha visto en otros estudios de producción de jugo, tal es el caso del trabajo de Kapasakalidis y colaboradores, quienes en el 2009 estudiaron la aplicación de un tratamiento enzimático y evaluaron las dosis y el tiempo, lo que permitió incrementar de un 50 % hasta un 60 % la extracción de antocianinas en jugos de zarzamoras. En otro estudio Buchert y colaboradores (2005) mostraron que el uso de preparados enzimáticos como Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Smash, Pectinex BE 3-L y Biopectinase CCM incrementaron el contenido de antocianinas de 13–41 % en jugos de arándanos y de 18–29 % en jugos de zarzamoras.

Según la literatura, si se aplica un tratamiento térmico a una pulpa de fruta o a un jugo se esperaría que la cantidad de antocianinas disminuya por degradación oxidativa; por ejemplo, Sadilova *et al.*, (2006) observaron que después de un calentamiento por 3 h a 95 °C los pigmentos disminuyeron en un 50%. Un escaldado a esa misma temperatura por 3 min y combinado con una pasteurización produjo una pérdida de un 43 % de antocianinas monoméricas en purés de bayas azules (Brownmiller *et al.*, 2008); pérdidas similares se observaron en purés de frambruesas (Ochoa *et al.*, 1999). En el 2010 Patras y colaboradores demostraron que la cianindina-3-glucósido y la pelargonidina-3-glucósido presentes en moras y fresas son afectadas por un tratamiento térmico a 70 °C durante 2 min. Pero existen estudios que aseguran que un escaldado previo de la fruta ayuda a la retención de los pigmentos, ya que se inactivan enzimas de la familia de las polifeniloxidasas; por ejemplo, Skrede *et al.*, (2000), demostraron que no hay pérdida de antocianinas en una pulpa previamente escaldada de arándanos, comparada con la pulpa pasteurizada de arándanos que no se sometió al escaldado, la cual presentó una pérdida del 50 %.

Con el caso del tratamiento térmico del jugo de fruta de huiscoyol, no se observan diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 9), por lo que se requeriría un mayor número de repeticiones para determinar si las antocianinas presentes en el fruto, las cuales, se presume, corresponden principalmente a cianidin-3-rutinósido, son estables térmicamente. Rubinskiene *et al.*, (2005), demostraron en zarzamora que esta antocianina exhibe una alta estabilidad a un tratamiento térmico de 95 °C. Aunado a eso, existen estudios que revelan que la co-pigmentación juega un papel

importante en la estabilidad de las antocianinas; por ejemplo, Dyrby *et al.* (2001) estudiaron la estabilidad de las antocianinas del repollo rojo, en comparación con las zarzamoras, uvas y saúco en un modelo de bebida carbonatada y observaron que existe una protección por parte de sistemas flavonoides presentes en la muestra. Como se observó en el perfil de compuestos polifenólicos del huiscoyol existen, tentativamente, derivados de catequina y de kaempferol que pueden ejercer un fenómeno de co-pigmentación y explicar eventualmente una estabilidad térmica de las antocianinas.

5.2.5 Vitamina C total

En el caso de la vitamina C, se sabe que es una vitamina muy sensible a cambios de pH, presencia de luz, oxígeno y temperatura, puede degradarse a especies menos activas por la acción de alguno de esos factores, por ello es un compuesto importante a la hora de evaluar el efecto del procesamiento en un alimento que contenga dicha vitamina. Se conoce por estudios previos que los tratamientos térmicos causan una disminución en la cantidad de vitamina C en fresas (Klopotek *et al.*, 2005) y en tomates (Gahler *et al.*, 2003).

Se observó que el fruto de huiscoyol no es una fuente importante de esta vitamina, los valores que se encontraron en la caracterización preliminar, en el objetivo 1, van desde no detectables (menores a 1,43 mg/100 g) hasta los 48 mg/100 g. En jugo prensado el contenido promedio de vitamina C total es muy bajo (13 mg/100 g), la especie presente, tanto en el jugo como en la fruta, corresponde al ácido dehidroascórbico, la especie oxidada del ácido ascórbico. Es por ello que, como se observa el cuadro 9, el contenido de vitamina C total no se ve afectado por el procesamiento de jugo, se mantiene después de un tratamiento enzimático y de un tratamiento térmico, y no hay degradación porque ya se encuentra en su forma más oxidada.

5.2.6 Efecto de operaciones unitarias en el procesamiento de huiscoyol en la actividad antioxidante determinada por el método ORAC

Aparte del contenido de compuestos bioactivos, es importante analizar si el procesamiento de la fruta para la producción de jugo afecta la capacidad antioxidante. En el caso del jugo se determinó dicha propiedad por el método ORAC; el fruto de huiscoyol presenta valores entre 32 649-56 057 μ moles de equivalentes de trolox/ 100 g de muestra seca, en el caso de los jugos procesados los datos se encuentran en los valores medios de ese rango (Cuadro 10).

Cuadro 10. Capacidad antioxidante del jugo prensado (A), jugo enzimado (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo enzimado y tratado térmicamente (D) en base fresca y base seca, con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor n= 3 para cada jugo.

Jugo	ORAC base fresca ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$)	ORAC base seca ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$)
A	5 732 \pm 773 ^A	39 755 \pm 1 833 ^A
B	5 128 \pm 883 ^A	36 125 \pm 3 630 ^A
C	5 063 \pm 1 080 ^A	35 918 \pm 6 352 ^A
D	4 525 \pm 1 180 ^A	31 481 \pm 4 986 ^A
Valor p	0,5555	0,2469

TE: equivalentes de trolox

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ORAC obtenidos para cada tratamiento en base fresca, lo que es acorde con lo observado en el contenido de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales y vitamina C total), en los que tampoco se determinó un cambio significativo entre los distintos tratamientos evaluados. Como se observa en la Figura 31, la capacidad antioxidante tiene una tendencia a disminuir con el procesamiento; si se analiza los valores promedio en el contenido de polifenoles totales, el jugo D presenta una disminución del 6 %, lo que quizás es una causa de que la capacidad antioxidante en este mismo producto descienda hasta un 20 %. Posiblemente durante la maceración enzimática y el tratamiento térmico, la exposición al oxígeno y a la temperatura genera algún tipo de reacción de degradación oxidativa de los compuestos fenólicos que explica dicho fenómeno.

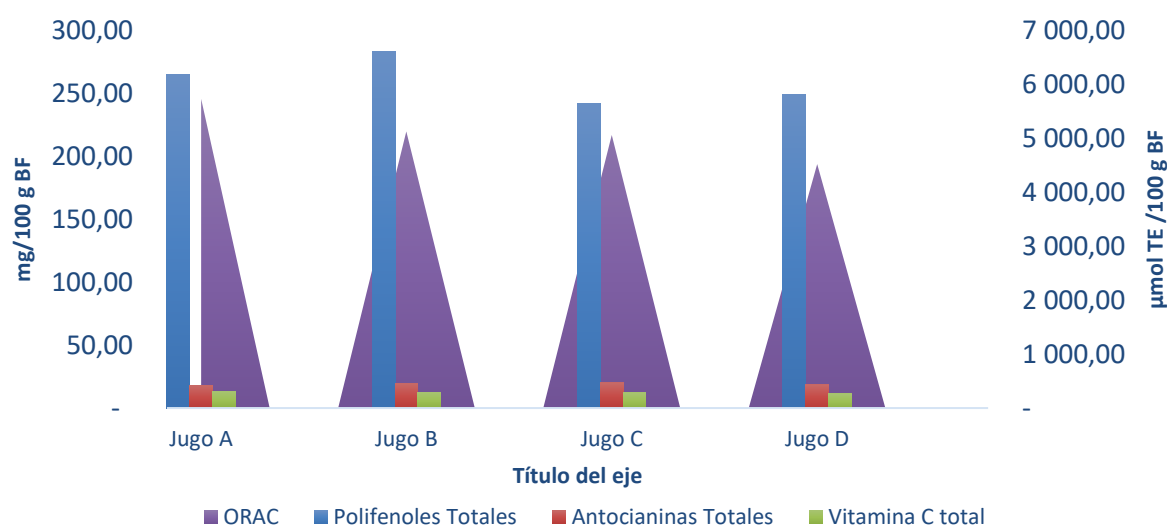


Figura 31. Variación del contenido de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C total) y la capacidad antioxidante ORAC de los diferentes jugos de huiacoyol obtenidos a escala piloto, Jugo prensado (A), jugo tratado enzimáticamente (B), jugo tratado térmicamente (C) y jugo con maceración enzimática, prensado y tratado térmicamente (D), n=3.

Se puede concluir que el procesamiento del huiscoyol para obtener jugo de este fruto no ejerce un impacto significativo sobre el contenido de compuestos bioactivos ni sobre la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC. Se puede establecer por lo tanto que para mejorar industrialmente la obtención de jugo con un mayor rendimiento es necesario realizar una maceración enzimática de la pulpa y para obtener un producto estable durante el almacenamiento a temperatura ambiente es recomendable la esterilización comercial.

5.3 Determinación del perfil nutricional, la composición de compuestos bioactivos (polifenoles totales, antocianinas totales, vitamina C) y la capacidad antioxidante por el método ORAC del jugo prensado de huiscoyol para evaluar su valor como materia prima en la elaboración de productos funcionales

El huiscoyol no es un fruto conocido en la mayoría del territorio costarricense, por lo que se puede considerar como un fruto no tradicional y subutilizado en la zona de Guanacaste. En esta provincia se consume como fruto fresco y como base para la elaboración de bebidas alcohólicas.

Como se evidenció en los dos objetivos anteriores, el huiscoyol es una fruta con características nutricionales y funcionales que evidencian su potencial para la obtención de jugo. Además, el procesamiento no afectaría significativamente el contenido en el jugo de compuestos bioactivos, tales como los polifenoles y la vitamina C, así como su capacidad antioxidante por el método ORAC. Por lo tanto, con el fin de valorar el uso de la fruta para producir jugo a nivel industrial como producto final o como materia prima para la elaboración de otras bebidas funcionales o productos terminados, se procedió a evaluar el contenido nutricional completo del jugo prensado, cuyo proceso se asemejaría al manejo que se le realizaría a la fruta en los hogares costarricenses para la obtención del jugo.

A partir de los tres jugos prensados obtenidos en planta piloto se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos correspondientes para conocer el valor nutricional, tales como: contenido de proteína, fibra dietética, carbohidratos disponibles, carbohidratos totales, grasa, contenido de minerales (Na, K, Ca y Fe). Los resultados obtenidos son reportados en el cuadro 11 expresados en 100 g de producto fresco, con base en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 de Etiquetado Nutricional (RTCA, 2011), y con los valores recomendados diarios para cada uno de los nutrientes, según la FAO/OMS y la FDA, se calcula en 100 g el porcentaje de requerimiento diario que aporta el jugo.

Cuadro 11. Composición química y nutricional del jugo prensado de huiscoyol.

Componente	Valores en 100 g ⁽¹⁾	% VDR en 100 g
Humedad (g)	86,9 ± 2,0	-
Cenizas (g)	0,7 ± 0,1	-
Proteína (g)	0,4 ± 0,2	0 %*
Grasa cruda (g)	0,14 ± 0,05	0 %**
Carbohidratos totales (g)	14,3 ± 2,2	5 %*
Azúcares simples (g)	7,0 ± 1,7	
Fibra dietética (g)	0,27 ± 0,04	1 %**
Carbohidratos disponibles (g)	14,0 ± 2,2	-
Acidez (g ácido succínico)	4,3 ± 0,1	-
Sodio (mg)	10,2 ± 0,6	0 %*
Hierro (mg)	0,97 ± 0,07	6 %
Calcio (mg)	12,9 ± 1,4	2 % *
Potasio (mg)	248 ± 30	7 % **
Vitamina C total (mg)	13 ± 2	20 %
Valor energético (kcal)	73 ± 8	-
Valor energético (kJ)	305 ± 35	-

VDR: Valor Diario Recomendado, se basa en una dieta de 2000 calorías, recomendada para adultos y niños mayores de 4 años, según

(1) valor promedio +/- desviación estándar; n=3

*OMS/FAO y **FDA. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades calóricas.

Con respecto a la fruta fresca (Cuadro 3), los valores de humedad, cenizas, proteína, carbohidratos y minerales que presenta el jugo prensado son comparables; lo cual es ventajoso porque se puede obtener el mismo valor nutricional de ambas fuentes. Pero existe una diferencia en el valor de fibra dietética, la fruta fresca presenta un valor promedio de 7,3 g / 100 g de fruta fresca, el cual disminuye aproximadamente veinte veces en el jugo prensado. Lo anterior es un resultado esperado, ya que cuando se obtiene el jugo prensado, la parte de la fruta que aporta el mayor porcentaje de fibra se queda en el residuo, que corresponde a la parte fibrosa de la pulpa y a la cáscara de la misma.

El sodio es uno de los minerales que según el RTCA (2011) es obligatorio declararlo en la etiqueta nutricional. La ingesta diaria recomendada por la OMS de este mineral es de 2 000 mg /día; se ha visto que un consumo superior a este valor estaría relacionado con enfermedades como hipertensión y enfermedades cardiovasculares, entre otros (https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake/es/). En el caso del jugo de huiscoyol prensado, el valor de sodio es de apenas 10 mg/ 100 g, por lo que puede realizarse la declaración de “bajo en sodio”, ya que su contenido es menor a 140 mg/100 g. Otro de los minerales importantes es el potasio, el cual es un tipo de electrolito que ayuda a la función del sistema nervioso, contracción de los músculos y regula el ritmo cardiaco. Permite que los nutrientes fluyan

hacia las células y a expulsar los desechos de estas, por lo que un consumo del mismo a través de la dieta es importante. A pesar de que el RTCA establece que, para que se declare como un alimento fuente de potasio este debe estar por encima del 7,5 % de VRD en 100 mL, en el caso del jugo prensado el aporte es de 7%, pero se podría valorar hacer esta declaración si se considera que para el RTCA la tolerancia es de 20 %.

El jugo prensado presenta un contenido de compuestos bioactivos que le confiere características para ser considerado un posible alimento funcional. En lo que respecta a la vitamina C, esta se encuentra en promedio en una concentración de 13 mg/100 g, que corresponde a un 20 % del VDR. Con este valor podría declararse como fuente de vitamina C, ya que contiene más del 15 % VRD según el RTCA. Pero existe la desventaja de que el contenido de esta vitamina es muy variable, ya que depende del período de cosecha de la fruta, como se observó en los resultados obtenidos en el Cuadro 4, y se puede tener frutos que presenten un contenido demasiado bajo de esta vitamina.

Otros de los compuestos bioactivos importantes son los polifenoles, el jugo prensado posee un valor de 265 ± 14 mg GAE/100 g de polifenoles totales, el cual es comparable a los valores reportados para otros jugos, especialmente los provenientes de bayas como arándano (342 mg/100 g), “sweet black cherry” o cereza negra dulce (323 mg/100 g), “black raspberry” o frambuesa negra (240 mg/100 g), jugo de “blackcurrant” o grosella negra (260 mg/100 g), jugo de arándano azul (236 mg/100 g), fresas (333 mg/100 g) y granadilla (351 mg/100 g), todos expresados como mg de GAE por 100 g. A manera de comparación, en el Cuadro 12 se presentan los valores nutricionales de algunos jugos. Se puede observar que el contenido nutricional es similar, no son jugos que aporten un contenido significativo de fibra dietética, ni de minerales como el sodio, calcio y hierro, pero cabe destacar que el jugo de huiscoyol posee un mayor aporte en potasio.

Por su contenido de carbohidratos totales el jugo de huiscoyol es comparable con el jugo de uva (14,55 g/100 g para uva roja y 15,12 g/100 g para uva blanca) ([USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27, 2014, Published online at: http://ndb.nal.usda.gov](http://ndb.nal.usda.gov)). Con esta última fruta, el huiscoyol posee semejanzas con respecto al contenido nutricional (Cuadro 12) y contenido de compuestos bioactivos como polifenoles y antocianinas.

Por todo lo anterior, el jugo de huiscoyol prensado es una opción de alimento funcional que puede ser promovido para ser consumido por la población costarricense, pero también puede ser

utilizado como materia prima para la elaboración de otros productos; por ejemplo se puede adicionar azúcar y someterlo a un proceso de fermentación con el fin de elaborar un licor, que se aproxime al vino, tanto en color como en contenido de polifenoles. Podría considerarse también como una base para la preparación de jaleas; además, se comprobó que los compuestos que originan el color se mantienen después de ser tratado térmicamente.

Cuadro 12. Composición química y nutricional de diversos jugos de frutas.

	H (g/100)	VE (kcal)	P (g/100)	G (g/100)	CT (g/100)	AT (g/100)	FD (g/100)	Minerales (mg/100 g)				VC (mg /100 g)
								Ca	Fe	Na	K	
Granadilla	85,9	54	0,15	0,29	13,13	12,65	0,1	11	0,10	9	214	0,1
Arándano azul^a	NR	42	0,0	0,0	10,0	7,92	0,0	8,0	0,15	6	75	0,0
Mora^a	90,9	38	0,20	0,60	7,8	7,70	0,1	12,0	0,48	1	135	11,3
Arándano rojo ^a	87,13	46	0,39	0,13	12,2	12,10	0,1	8,0	0,25	2	77	9,3
Uva roja^a	85,00	57	0	0	14,5	14,11	0,1	7,0	0,13	9	33	6,5

H: Humedad, VE: valor energético, P: proteína, G: Grasa, CT: carbohidratos totales, AT: azúcares totales, FD: fibra dietética, VC: vitamina C. a) Datos tomados del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) National Nutrient Database for Standard Reference, Published online at: <http://ndb.nal.usda.gov/>.

5.4 Determinación mediante la técnica de separación HPLC, los cambios a nivel semi-cuantitativo (aumento, disminución, aparición o desaparición) de las señales de algunos de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el fruto de huiscoyol y en los jugos obtenidos, con el fin de evaluar la estabilidad de estos biomarcadores

Según lo observado en los análisis realizados durante el desarrollo del objetivo 2, no existe diferencia significativa en el contenido de polifenoles totales luego de aplicarse tanto un tratamiento enzimático como un tratamiento térmico al jugo prensado de huiscoyol. Pero en la Figura 31 se puede observar que existe un ligero aumento (estadísticamente no significativo) del 6,94 % en el contenido de polifenoles totales con la maceración enzimática y, con el tratamiento térmico, más bien hay una disminución (estadísticamente no significativa) del 8,6 %. En el contenido de las antocianinas totales se observó un aumento de aproximadamente un 10 % (estadísticamente no significativo) con cada uno de los tratamientos.

Con base en estos resultados, se estudió con mayor detalle el efecto de los tratamientos enzimáticos y térmicos sobre el perfil de compuestos polifenólicos. Como se describió en el objetivo 1, con la ayuda de ULPC-MS se evidenció que los compuestos polifenólicos que están presentes en el fruto de huiscoyol son en su mayoría taninos, de la familia de las procianidinas, y derivados de las

catequinas, así como flavanoles mono y diglicosidados derivados del kaempferol, además, el huiscoyol cultivado en Costa Rica, presenta como antocianina mayoritaria la cianidina-3-rutinósido.

Se realizó el mismo análisis, que se le aplicó a la fruta fresca, a los cuatro jugos obtenidos a escala piloto con el protocolo UPLC-MS. Se enfrentaron problemas técnicos ya que las señales observadas eran muy pequeñas y no se obtenían buenos resultados, por lo que se debió cambiar de equipo, imposibilitando una comparación directa con los compuestos propuestos en el fruto fresco.

Se propone entonces utilizar la técnica de HPLC-MS utilizando un equipo HPLC Agilent 1260 Infinity con un detector simple Quadrupole 6120. La separación se logró con una columna Phenomenex Luna 5 μm C18, 100Å, tamaño 150 mm x 2,00 mm y su respectiva precolumna. Se usó como sistema de fases móviles: ácido fórmico 0,1% como fase móvil A y acetonitrilo con 0,1 % ácido fórmico como fase móvil B. Se utilizó un sistema de gradiente programado de la siguiente manera: 0 a 20 min, de 5 a 25% B; 20 a 25 min, de 25 a 80% B; 25 a 27 min, a 100 % B, 27 a 35 min a 5% B; con un flujo de 0,3 mL/min a 30 °C. Las señales fueron detectadas y analizadas a 70 eV en modo positivo inyectando 20 μL de cada muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 13, se trabajó en modo positivo y se observaron 24 señales en donde, el compuesto mayoritario en proporción relativa corresponde a la cianidina-3-rutinósido (señal 10). En forma general, no hay diferencia significativa en el porcentaje relativo de la mayoría de las 24 señales con respecto al jugo prensado ($p < 0,05$). Se observa que cuando se aplica un tratamiento enzimático seguido de un tratamiento térmico, las señales indicadas como 4, 5, 6 y 18 desaparecen, por lo que se puede asumir que ambos tratamientos producen una degradación en algunos compuestos presentes en la muestra. La señal 14 también exhibe una diferencia significativa con el tratamiento térmico pues se observa una disminución en el porcentaje relativo. La señal 16 disminuye con la maceración enzimática, con el tratamiento térmico y con ambas opciones juntas. Por último, la señal 23 muestra un aumento en el porcentaje relativo con el tratamiento enzimático.

Cuadro 13. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-MS en modo positivo presente en cada uno de los jugos de huiscoyol obtenidos con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% con un valor $n= 3$ para cada jugo.

JUGO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
A	7,73 ^A	4,30 ^A	4,26 ^A	0,80 ^A	2,58 ^A	0,90 ^A	3,67 ^A	7,68 ^A	2,73 ^A	40,57 ^A	2,10 ^A	5,87 ^A

B	7,10 ^A	3,18 ^A	3,33 ^A	0,69 ^A	1,14 ^A	0,80 ^A	4,05 ^A	6,24 ^A	2,66 ^A	42,74 ^A	2,15 ^A	5,77 ^A
C	8,49 ^A	3,78 ^A	4,35 ^A	0,37 ^B	0,67 ^B	0,52 ^A	3,91 ^A	7,71 ^A	2,78 ^A	41,47 ^A	2,05 ^A	6,12 ^A
D	9,49 ^A	2,65 ^A	4,59 ^A	NA	NA	NA	3,88 ^A	7,12 ^A	2,69 ^A	49,90 ^A	1,76 ^A	3,88 ^A
Valor p	0,686	0,089	0,651	0,009	0,020	0,137	0,957	0,066	0,997	0,129	0,738	0,251
JUGO	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
A	2,56 ^A	0,64 ^A	0,81 ^A	1,69 ^A	0,64 ^A	0,88 ^A	0,32 ^A	2,48 ^A	1,43 ^A	5,37 ^A	0,72 ^A	1,55 ^A
B	3,09 ^A	0,63 ^A	0,81 ^A	0,65 ^B	3,10 ^B	0,71 ^A	0,53 ^A	2,24 ^A	1,31 ^A	4,87 ^A	0,97 ^B	1,24 ^A
C	3,34 ^A	0,23 ^B	0,40 ^B	0,67 ^B	2,04 ^C	0,60 ^A	0,27 ^A	2,32 ^A	0,81 ^A	5,28 ^A	0,71 ^A	1,12 ^A
D	3,18 ^A	0,16 ^{AB}	0,35 ^B	0,44 ^B	0,56 ^A	NA	0,27 ^A	2,29 ^A	0,60 ^A	5,11 ^A	0,35 ^A	0,74 ^A
Valor p	0,688	0,005	0,001	0,003	0,001	0,117	0,497	0,908	0,056	0,530	0,004	0,324

Para una misma columna y jugo, promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas.

Al realizarse el análisis en HPLC-MS en modo positivo se está incurriendo en una subestimación de los posibles compuestos presentes, ya que solamente se observan aquellos compuestos que ionizan de una mejor manera en estas condiciones, dejando por fuera aquellos que pueden ionizar en modo negativo. Esto se evidenció al realizar posteriormente el análisis del perfil de compuestos en el fruto, donde se encontraron mayor cantidad de compuestos y mejor resueltos en modo negativo dadas las características estructurales de los compuestos.

Es por ello que se optó por repetir el análisis utilizando HPLC-DAD, el cual aunque no presenta un detector tan sensible como el masas, permitió observar la totalidad de los compuestos utilizando una única longitud de onda (280 nm), en la cual todas las familias presentes en el huiscoyol absorben y presentan señal, facilitando así el análisis de las muestras. Se analizó un extracto de fruta fresca y éste presenta a 280 nm el perfil de la Figura 32, donde se observan 35 señales, las cuales, como se muestra en el Cuadro 14, se encuentran en un rango de valores de 0,01 y 19,4 %, siendo el mayoritario nuevamente la antocianina (14 min, señal 22).

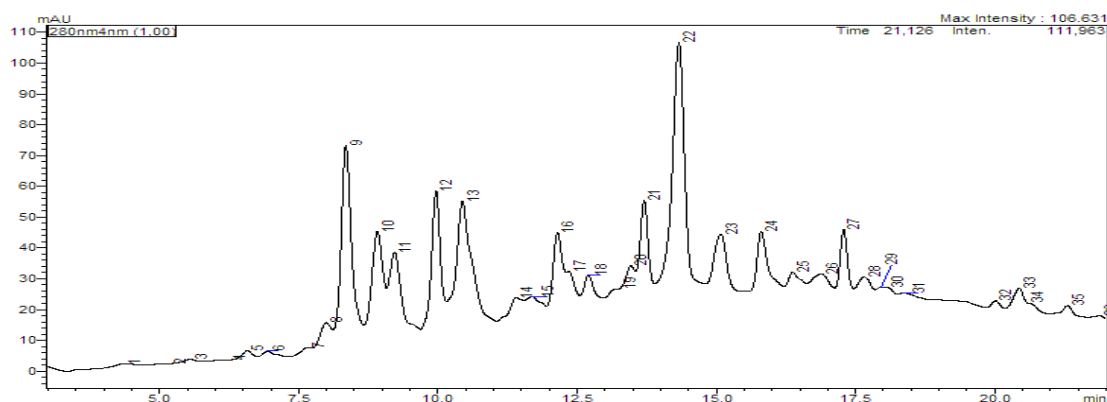


Figura 32. Cromatograma del perfil de compuestos polifenólicos determinados por HPLC-DAD en un extracto de fruta fresca.

Cuadro 14. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-DAD positivo presente en un extracto de fruta fresca.

Señal	TR (min)	Area	% relativo	Señal	TR (min)	Area	% relativo
1	4,376	19377	0,33	19	13,266	2688	0,05
2	5,175	605	0,01	20	13,468	50893	0,88
3	5,557	13528	0,23	21	13,704	256211	4,42
4	6,25	1598	0,03	22	14,328	1122271	19,37
5	6,58	30388	0,52	23	15,082	247539	4,27
6	6,944	38225	0,66	24	15,808	225306	3,89
7	7,663	7072	0,12	25	16,374	47208	0,81
8	7,993	40391	0,70	26	16,884	72969	1,26
9	8,347	688133	11,88	27	17,288	160079	2,76
10	8,916	389411	6,72	28	17,648	48068	0,83
11	9,222	296784	5,12	29	17,955	9755	0,17
12	9,967	512172	8,84	30	18,069	10439	0,18
13	10,441	763908	13,18	31	18,367	12258	0,21
14	11,407	65437	1,13	32	20,014	22850	0,39
15	11,689	67800	1,17	33	20,438	93255	1,61
16	12,15	239754	4,14	34	20,578	32390	0,56
17	12,352	86436	1,49	35	21,308	39904	0,69
18	12,702	64257	1,11				

Se realizó la inyección de cada una de las muestras de jugo (A, B, C y D) con las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de fruta fresca. Como se observa en la Figura 33 A y B, el perfil de compuestos polifenólicos en los jugos corresponde, al igual que en la fruta fresca, a 35 compuestos

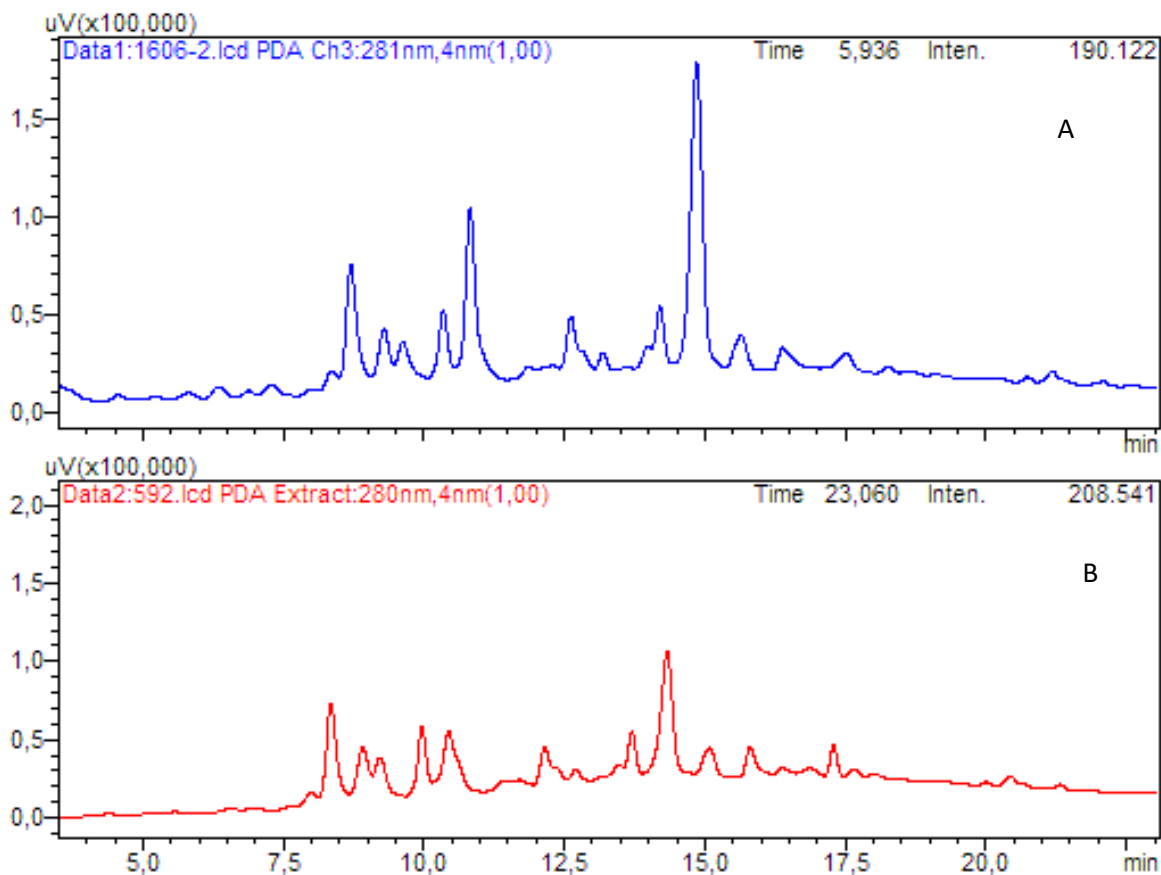


Figura 33. Comparación de cromatogramas del perfil de compuestos polifenólicos determinados por HPLC-DAD en a) un jugo prensado de huiscoyol y b) un extracto de fruta fresca.

Se encontró que el porcentaje relativo de los compuestos observados en los jugos se amplió, dado que el rango de los valores varía entre 0,2 y 35 %, debido, posiblemente, a que el prensado ayuda a liberar aquellos polifenoles “no extraíbles” que se encuentran ligados a la pulpa y las paredes de la cáscara. Aunado a esto, es posible que la maceración enzimática favorezca también la extracción de una mayor cantidad de polifenoles. Apesar de que se observan 35 señales, se realizó el análisis estadístico para ver el efecto del procesamiento, considerando solo aquellos compuestos que presentan un porcentaje por encima de 1 %; de esta forma se analizaron los efectos del procesamiento en solo 24 señales y los resultados se observan en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Porcentaje relativo de cada compuesto polifenólico identificado por HPLC-DAD positivo presente en cada uno de los jugos de huiscoyol con su respectivo valor p del análisis de varianza a 95% para un n = 3 para cada jugo.

	<i>Jugo A</i>	<i>Jugo B</i>	<i>Jugo C</i>	<i>Jugo D</i>	
Compuesto	% relativo \pm SD	% relativo \pm SD	% relativo \pm SD	% relativo \pm SD	Valor p
3	0,78 \pm 0,13 ^{ab}	0,59 \pm 0,09 ^b	0,92 \pm 0,09 ^{ab}	1,29 \pm 0,38 ^a	0,0186
4	1,02 \pm 0,20 ^{ab}	0,64 \pm 0,14 ^b	1,06 \pm 0,03 ^{ab}	1,31 \pm 0,22 ^a	0,0082
6	1,27 \pm 0,01 ^a	1,09 \pm 0,08 ^a	1,20 \pm 0,16 ^a	1,31 \pm 0,18 ^a	0,2286
9	9,18 \pm 0,36 ^a	8,78 \pm 0,55 ^a	9,37 \pm 0,69 ^a	9,94 \pm 0,55 ^a	0,1475
10	4,15 \pm 0,16 ^a	4,39 \pm 0,41 ^a	4,19 \pm 0,37 ^a	4,44 \pm 0,23 ^a	0,5999
11	3,18 \pm 0,19 ^{ab}	3,84 \pm 0,32 ^a	2,72 \pm 0,36 ^b	2,90 \pm 0,54 ^{ab}	0,0277
12	5,48 \pm 0,27 ^a	5,25 \pm 0,41 ^a	5,43 \pm 0,15 ^a	5,97 \pm 0,31 ^a	0,0894
13	14,61 \pm 1,17 ^a	14,84 \pm 0,51 ^a	15,00 \pm 0,89 ^a	16,30 \pm 1,02 ^a	0,1957
14	0,81 \pm 0,05 ^a	0,79 \pm 0,13 ^a	0,80 \pm 0,20 ^a	0,92 \pm 0,06 ^a	0,5928
16	4,06 \pm 0,47 ^a	3,78 \pm 0,08 ^a	3,82 \pm 0,28 ^a	4,05 \pm 0,37 ^a	0,6273
17	1,21 \pm 0,42 ^a	1,34 \pm 0,39 ^a	1,19 \pm 0,46 ^a	1,32 \pm 0,41 ^a	0,9627
18	0,95 \pm 0,02 ^a	1,04 \pm 0,09 ^a	1,00 \pm 0,06 ^a	0,86 \pm 0,08 ^a	0,0524
20	1,49 \pm 0,13 ^a	1,78 \pm 0,26 ^a	1,35 \pm 0,17 ^a	1,23 \pm 0,38 ^a	0,1253
21	4,53 \pm 0,25 ^a	4,24 \pm 0,30 ^a	4,61 \pm 0,34 ^a	4,92 \pm 0,57 ^a	0,2718
22	31,69 \pm 1,16 ^a	30,95 \pm 0,70 ^a	34,50 \pm 0,82 ^a	31,33 \pm 2,53 ^a	0,0679
23	3,10 \pm 0,45 ^{ab}	3,86 \pm 0,16 ^a	2,39 \pm 0,16 ^b	3,02 \pm 0,35 ^b	0,0028
24	2,61 \pm 0,41 ^{ab}	3,44 \pm 0,42 ^a	1,54 \pm 0,11 ^b	1,79 \pm 0,74 ^b	0,0047
25	0,68 \pm 0,19 ^{ab}	0,52 \pm 0,19 ^b	0,46 \pm 0,08 ^b	1,01 \pm 0,23 ^a	0,0257
26	2,60 \pm 0,19 ^a	2,26 \pm 0,74 ^a	2,08 \pm 0,30 ^a	1,44 \pm 0,18 ^a	0,0751
34	1,05 \pm 0,03 ^a	1,15 \pm 0,03 ^a	1,29 \pm 0,16 ^a	1,13 \pm 0,18 ^a	0,1759

Para una misma fila, promedios con letras diferentes presentan diferencias significativas.

Al igual que lo concluido con el análisis de HPLC-MS para la fruta fresca, el componente mayoritario en los jugos de huiscoyol correspondió a la cianidina-3-rutinósido (compuesto 22) con un 30,95 % relativo y no se ve afectado por los diferentes tratamientos. Las señales 4, 11, 23, 24 y 25 presentan valores $p < 0,05$ por lo que sí existen diferencias significativas con los tratamientos realizados. Se comparó los tratamientos de maceración enzimática (Jugo B), tratamiento térmico (Jugo C) y ambos (Jugo D) con el prensado (Jugo A) y solamente en la señal 4 hay una disminución (37 %) cuando se le aplica una maceración enzimática al jugo A y un ligero aumento (7,6 %) en la señal 25 cuando se aplican al jugo ambos tratamientos. Las diferencias en las señales 11, 23 y 24 entre el jugo B y C se pueden deber a variación entre lotes y no por tratamiento.

Con estos resultados se puede sugerir que la mayoría de los polifenoles presentes en el huiscoyol son térmicamente estables bajo las condiciones utilizadas. Aunque se esperaría que un

tratamiento enzimático provoque un aumento en la cantidad de polifenoles, así como la obtención de los llamados polifenoles “no extraíbles”, aumentando la cantidad relativa de estos compuestos, los resultados obtenidos indican que, para el huiscoyol, las variaciones son no significativas.

6 Conclusiones

- Dado el contenido promedio de fibra dietética (7,3 g/100 g base fresca), el huiscoyol podría considerarse como fuente de este nutriente.
- El contenido promedio de potasio (307 mg/100 g base fresca) en el fruto de huiscoyol representa un 12% del valor diario recomendado para este mineral.
- El fruto de *B. guineensis* que se cultiva en Costa Rica presenta valores de polifenoles totales entre 219,30 – 1 013, 13 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g de fruta fresca, los cuales son comparables con los reportados en frutos como el *tucum-do-cerrado* (*Bactris setosa*), arándanos, zarzamoras o moras, fresas y frambuesas; clasificándose, así como una fruta con alto contenido en polifenoles, según reportes de la literatura.
- Según el análisis UPLC-MS, tanto en modo negativo como en modo positivo, en un extracto de fruta fresca de huiscoyol se pueden elucidar tentativamente 22 compuestos, los cuales, con la ayuda de literatura y diferentes bases de datos, tentativamente se identificaron como: derivados glucosidados del kaempferol, antocianinas como la cianidina-3-O-rutinósido, y flavon-3-oles como procianidinas diméricas, triméricas o tetraméricas. Este perfil concuerda con lo reportado en *tucum-do-cerrado* (*Bactris setosa*), un fruto brasileño de la misma familia que el huiscoyol.
- El color rojo-púrpura particular del huiscoyol se debe a la presencia de antocianinas, cuyo valor se encuentra entre 28,3-47,9 mg de equivalentes de cianidina-3-glucósido /100 g de fruto fresco, el cual es similar al reportado en las cerezas, frambuesas, zarzamoras oscuras (moradas), zarzamoras o moras y *tucum-do-cerrado*.
- Según el análisis por HPLC-DAD, el extracto de huiscoyol presenta una señal cuyo tiempo de retención y espectro de absorción coinciden con el estándar de cianidina-3-O-rutinósido. Esto es confirmado con el análisis en UPLC-MS, donde se obtiene un

ion molecular de m/z 595,1574, con un fraccionamiento de M-146 (m/z 449) y M-308 (m/z 287), el cual es igual al reportado en la literatura y el obtenido de la fragmentación del estándar de esta antocianina.

- Por el contenido de polifenoles y de antocianinas el fruto de huiscoyol posee una capacidad antioxidante determinada mediante el método ORAC de 326-561 μmol de equivalentes de Trolox / g de muestra seca. Dicho valor se encuentra entre los más altos comparado con los reportes en la literatura para las moras, arándanos, uvas y frambruesas.
- Durante el procesamiento de huiscoyol para la elaboración del jugo, el contenido de polifenoles totales no se ve afectado significativamente por la maceración enzimática del fruto de huiscoyol y se aumentó el rendimiento en un 4% en la obtención de jugo, con respecto al jugo únicamente prensado.
- El tratamiento térmico a 85 °C por 2-5 s no afectó significativamente el contenido de polifenoles totales, en relación con el jugo prensado, contrario a lo reportado en la literatura para otros frutos, posiblemente debido a las características estructurales de los compuestos polifenólicos presentes en *B. guineensis*.
- El contenido de vitamina C total no se ve afectado significativamente por el procesamiento del jugo (cuyo contenido promedio fue 13,1 mg/100 g jugo prensado). El valor de esta vitamina se mantiene después de una maceración enzimática y de un tratamiento térmico, no se presenta degradación por oxidación porque ya se encuentra en su forma más oxidada.
- El tratamiento enzimático y el térmico no generaron cambios significativos en la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC, cuyo valor promedio fue 5 732 micromoles de equivalentes de trolox por 100 g de jugo prensado.
- Los valores en los macronutrientes y compuestos bioactivos de la fruta fresca son semejantes a los obtenidos en el jugo prensado, a excepción del contenido de fibra dietética, el cual disminuye aproximadamente veinte veces en el jugo prensado.
- Con los resultados obtenidos en el análisis del perfil de compuestos polifenólicos en cada uno de los jugos, es posible inferir que este tipo de compuestos son

térmicamente estables bajo las condiciones de esterilización, ya que no se presentó diferencias significativas en la concentración relativa y se mantuvieron los 22 compuestos detectados en el fruto.

7 Recomendaciones

- Se recomienda ampliar el estudio del perfil nutricional del fruto de huiscoyol tomando en cuenta como variables de muestreo la zona geográfica y la época de cosecha, con el fin de que caracterizar mejor este fruto.
- Se recomienda realizar un mayor número y tipo experimentos de fragmentación en UPLC-MS, en el extracto de fruto fresco, para elucidar de mejor manera el perfil de los compuestos fenólicos presentes en el huiscoyol.
- Asimismo, sería recomendable realizar una separación, concentración y análisis por RMN para lograr la identificación no tentativa de los compuestos polifenólicos presentes en el huiscoyol
- Se propone además analizar el efecto del almacenamiento del jugo de huiscoyol tratado enzimáticamente y esterilizado comercialmente, con el fin de determinar la estabilidad a lo largo del tiempo de los compuestos fenólicos.

8 Referencias

- Acosta- Estrada B.A., Gutiérrez-Urbe J.A., Serna-Saldívar S.O., (2014), Bound phenolics in foods, a review, *Food Chemistry* 152: 46–55.
- Acosta O., Pérez A., Vaillant F., (2009), Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59: 88-94.
- Ajila M., Brar S., Verma M., Tyagi R., Godbout S., Valéro J., (2011), Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends, *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3): 227–249.
- Albertini M.V., Carcouet E., Pailly O., Gambotti C. Luro F., Berti I., (2006), Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8335-8339.
- Aleixandre A., Miguel M., (2008), Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 905–912.
- Almeida M., De Souza P., Arriaga A., Prado G., Magalhães C., Maia G., Lemos T., (2011), Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil, *Food Research International*, 44 (7): 2155-2159.
- Alper N., Bahçeci K., Acar J., (2005), Influence of processing and pasteurization on color values and total phenolic compounds of pomegranate juice, *Journal of Food Processing and Preservation*, 29: 357–368.
- Álvarez E., Orallo F., (2012), Actividad biológica de los flavonoides (I), Acción frente al cáncer, OFFARM, 22 (10): 130-140.
- Ameer K., Muhammad H., Kwon J., (2017), Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their by products: A review comprehensive, *Reviews in Food Science and Food Safety*, 16: 295-315.
- Anton D., Bender I., Kaart T., Roasto M., Heinonen M., (2017), Changes in polyphenols contents and antioxidant capacities of organically and conventionally cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits during ripening, *International Journal of Analytical Chemistry*, ID 2367453.
- AOAC (2012), Official Method of Analysis: Association of Analytical Chemists. 19th Edition, Washington DC, 121-130. Apak R., Tütem E., Özyürek M., Güçlü K., (2011), Antioxidant activity/capacity assay, methods applied to fruit and cereals. En Tokuşoğlu O., & Hall C., Fruit and cereal bioactives sources, chemistry, and applications, CRC Press.

- Assefa A.D., Jeong, Y.J., Kim D.J., Jeon Y.A., Ok H.C., Baek H.J., Sung, J.S., (2018), Characterization, identification, and quantification of phenolic compounds using UPLC-Q-TOF-MS and evaluation of antioxidant activity of 73 perilla frutescens accessions, *Food Research International*, 111, 153–167.
- Azofeifa G., Quesada S., Pérez A.M., Vaillant F., Michel A., (2018), Effect of an in vitro digestion on the antioxidant capacity of a microfiltrated blackberry juice (*Rubus adenotrichos*), *Beverages* 4,30.
- Barberán T., (2003) Los polifenoles de los alimentos y la salud, *Alimentacion, Nutricion y Salud*, 10 (2): 41-53.
- Baumann J.W., (1981), Application of Enzymes in Fruit Juice Technology, In: Birch G.G., Blakebrough N., Parker K.J, (eds) *Enzymes and Food Processing*, Springer, Dordrecht.
- Begoña de Ancos E., Gonzalez M., Cano P., (1999), Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition, *Lebensm Unters Forsch*, 208: 33.
- Begoña de Ancos E., González M., Cano P., (2000), Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8: 4565-4570.
- Borowska E.J., Szajdek A., Czaplicki S., (2009), Effect of heat and enzyme treatment on yield, phenolic content and antioxidant capacity of juices from chokeberry mash, *Italian Journal of Food Science*, 21(2): 1-14.
- Brousse M., Martos M., Cruz N., (2010), Viscosidad y densidad de jugo de uva (Isabella) para aplicaciones de procesos, *Revista de Ciencia y Tecnología*, 13.
- Brownmiller C., Howard L.R., Prior R.L., (2008), Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color and antioxidant capacity of processed blueberry products, *Journal of Food Science*, 73 (5): 72-79.
- Buchert J., Koponen M., Suutarinen M., Mustranta A., Lille M., Törrönen R., Poutanen K., (2005), Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (15), 2548–2556.
- Carpenter D.E., Ngeh-Ngwainbi J., Lee S., (1993), Lipid Analysis. Enn Sullivan D, Carpenter D., *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*, AOAC International, p, 3-26.
- Castañeda A., Guerrero J.A., (2015), Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas, *Temas Selectos de ingeniería de Alimentos*, 9: 24-33.
- Cheyrier V., (2005), Polyphenols in foods are more complex than often thought, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 223–229.
- Chízmár Fernández C., (2009), Plantas comestibles de Centroamérica, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio, 1era Edición.

- CITA, (2014 a), Determinación del pH, P-SA-MQ-012, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 b), Determinación de la acidez titulable, P-SA-MQ-011, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 c), Determinación del contenido de sólidos solubles, P-SA-MQ-046, Emisión N° 1, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 d), Determinación del contenido de humedad, P-SA-MQ-002, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 e), Determinación del contenido de proteína, P-SA-MQ-003, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 f), Determinación del contenido de grasa cruda por extracto etéreo, P-SA-MQ-005, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 g), Determinación del contenido de cenizas totales, P-SA-MQ-004, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 h), Determinación del contenido de fibra dietética total por método enzimático, P-SA-MQ-007, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 i), Determinación del contenido de minerales por espectrofotometría de absorción atómica, P-SA-MQ-035, Emisión N° 1, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 j), Determinación del color, P-SA-MQ-045, Emisión N° 1, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 k), Determinación del contenido de azúcares por HPLC, P-SA-MQ-006, Emisión N° 6, San José, Costa Rica.
- CITA, (2014 l), Determinación del Vitamina C total por HPLC, P-SA-MQ-024, Emisión N° 5, San José, Costa Rica.
- CITA, (2016 m), Determinación de ácidos orgánicos por HPLC, P-SA-MQ-051, Emisión N° 2, San José, Costa Rica.
- CITA, (2016 n), Determinación antocianinas totales, P-SA-MQ-047, Emisión N° 3, San José, Costa Rica.
- CITA, (2016 o), Determinación polifenoles totales, P-SA-MQ-048, Emisión N° 4, San José, Costa Rica.
- CITA, (2016 p), Determinación de la actividad antioxidante, método ORAC con espectrofluorómetro Biotek, P-SA-MQ-037, Emisión N° 9, San José, Costa Rica.
- Collins A. (2005), Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 261–267.
- ColorFlex EZ., (2013), User's manual, Manual Versión 1,2, USA.

- De Brito E., Pessanha de Araújo M.C., Alves R.E., Carkeet C., Clevidence B.A., Novotny J.A. (2007) Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9389–9394.
- Dembitsky V., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtenberg S., Gorinstein S., (2011), The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites, *Food Research Intenational*, 44: 1671-1701.
- Dhingra D., Michael M., Rajput H., Patil R., (2012), Dietary fibre in foods: a review, *Journal Food Science Technology*, 49(3): 255–266.
- Dyrby, M., Westergaard, N., Stapelfeldt H., (2001), Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink models systems, *Food Chemistry*, 72(4): 431–437.
- Ek S., Kartimo H., Mattila S., Tolonen A., (2006), Characterization of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26): 9834-9842.
- FAO/OMS, directrices sobre etiquetado nutricional en <http://www.fao.org/ag/humannutrition/33311-065a023f960ba72b7291fb0bc07f36a3a.pdf>
- FDA, Nutrition Facts Labeling Requirements en <https://www.fda.gov/media/99059/download>.
- Flores G., Dastmalchi K., Wu S.B., Whalen K., Dabo A.J., Reynertson K.A., Foronjy R.F., D' Armiento, J.M., Kennelly E.J., (2013), Phenolic-rich extract from the Costa Rican Guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy, *Food Chemistry* 141: 889–895.
- Florian C., Stintzing A., Reinhold C., Balz F., Wrolstad R.E, (2002), Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21): 6172–6181.
- Gahler S., Otto K., BoHm V., (2003), Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7962-7968.
- Galeano G., Bernal R., (2010), Palmas de Colombia, Santafé de Bogotá, Colombia: Panamericana Formas e impreso S.A., p, 429-31.
- Gancel A., Feneuil A., Acosta O., Pérez A.M., Vaillant F., (2012), Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*), *Food Research International*, 44: 2243–225.
- Garguillo M., Magnuson B., Kimball L., (2008), A Field Guide to Plants of Costa Rica, ISBN: 9780195188257.

- Garzon G., Riedl K., Schwartz S., (2009), Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in andes berry (*Rubus glaucus Benth*), *Journal of Food Science* , 74 (3) : C227-32.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M., (2005), Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1370-1373.
- Gil-Izquierdo A., Gil M., Ferreres F., (2002), Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5107-5114.
- González E., Vaillant F., Pérez A., Rojas G., (2012), In vitro cell-mediated antioxidant protection of human erythrocytes by some common tropical fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2: 3-8.
- Gordon A., Jungfer E., da Silva B.A., Maia J.G.S., Marx F., (2011), Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7688–7699.
- Hager T., Howard L., Prior R., (2008), Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 689–695.
- Hager T., Howard L., Prior R., (2010), Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 11749-11754.
- Hagerman A. E. 2002. Vanillin Assay. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf> julio 2015.
- Henderson A., (2000), *Bactris (Palmae)*, *Flora Neotropica* 79: 1-181.
- Hernández Y., Lobo M. G., González M., (2006), Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods, *Food Chemistry*. 96: 654-664.
- Ho Y.C., Yu H.T., Su N.W., (2012), Re-examination of chromogenic quantitative assay for determining flavonoid content, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2674-81.
- Huang D., Ou B., Hampsch H., Flanagan J., Prior R., (2002), High-t assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC), using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (16): 4437-4444.
- Hui Y., (2006), Handbook of fruits and fruit processing, Blackwell Publishing, Iowa 50014, USA.
- Ioannou I., Hafsa I., Hamdi S., Charbonnel C., Ghouli M., (2012), Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior, *Journal of Food Engineering*, 111: 208–217.
- Johnson I.T., Williamson G., Musk S.R., (1994), Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients. *Nutrition Research Reviews* 7: 175–204.

- Kahkonen M., Heinama J., Ollilainen V., Heinonen M, (2003), Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1403–1411.
- Kajdžanoska M., Gjamovski V., Stefova M., (2010), HPLC-DAD-ESI-MS identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 29 (2): 181–194.
- Kalt W., (2005), Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants, *Journal of Food Science*, 70 (1): 11-19.
- Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A., (2004), Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4360-4367.
- Kapasakalidis P., Rastall R., Gordon M., (2009), Effect of a cellulase treatment on extraction of antioxidant phenols from black currant (*Ribes nigrum* L.) pomace, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4342–4351.
- Kevers C., Pincemail J., Tabart J., Jefraigne O., Dommes J., (2011), Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6165–6171.
- Klopotek Y., Otto K., Bohm V., (2005), Processing strawberries to different products alters contents of vitamin c, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5640-5646.
- Kondratyuk T., Pezzuto J., (2004), Natural product polyphenols of relevance to human health, *Pharmaceutical Biology*, 42: 46–63.
- Kowalska K., Olejnik A., Szwajgier D., Olkowicz M., (2017) Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells., *PLoS ONE*, 2, e0188583.
- Koley T.K., Khan Z., Oulkar D., Singh, B.K., Maurya A., Singh B., Banerjee K., (2017), High resolution LC-MS characterization of phenolic compounds and the evaluation of antioxidant properties of a tropical purple radish genotype Arabian, *Arabian Journal of Chemistry*, article in press.
- Landbo A., Meyer A., (2004), Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5 (4), 503-513.
- Lazarus S., Adamson G., Hammerstone J., Schmitz H., (1999), High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3693-3701.

- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E., (2002), Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatments, *Journal of Food Science*, 67: 1660–1666.
- Li H., Deinzer M., (2007), Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins, *Analytical Chemistry*, 79: 1739-1748.
- López S., Martí M., Sequeda L., Celis C., Sutachana J., Albarracín S., (2017), Cytoprotective action against oxidative stress in astrocytes and neurons by *Bactris guineensis* (L.) H.E. Moore (corozo) fruit, *Food and Chemical Toxicology*, 109: 1010-1017.
- Lorente J., Martí, N., Saura D., (2014), Advances in fruit juice conventional thermal processing contemporary food engineering. En Falguera V., Ibars A. Juice Processing quality, safety and value-added opportunities, CRC Press.
- Lykkesfeldt J., (2000), Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride, *Analytical Biochemistry*, 282: 89-93.
- Maestro R., Borja R., (1993), Actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos, *Grasa y Aceites*, 44: 101-107.
- Mahattanatawee K., Manthey J., Luzio G., Talcott S., Goodner K., Baldwin E., (2006), Total antioxidant activity and fiber content of select florida-grown tropical fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7355-7363.
- Manach C., Mazur A., Scalbert A., (2005), Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinion in Lipidology*, 16: 1-7.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Martínez S., González J., Culebras J., Tuñón M., (2002), Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutrición Hospitalaria*, 17 (6): 271-278.
- Masís A., Espinoza R., Guadamuz A., Chavarría F., Pérez D., (1998), Species Page de *Bactris guineensis* *Arecaceae* 2000, Species Home Pages, Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica: http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/magnoliophyta/arecaceae/bactris_guineensis/b_guineensis30jun2000/b_guineensis30jun2000.html
- Mazzotta A.S., (2001), Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria Monocytogenes* in fruit juices, *Journal of Food Protection* 64 (3): 315-320.
- Menchu M., Méndez H., (2007), Tabla de composición de Alimentos de Centroamérica, INCAP/OPS, 2da Ed.

- Mertz C., Cheynier V., Günata Z., Brat P., (2007), Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, (21):8616-24.
- Mikulic M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F., Veberic R., (2012), Composition of sugar, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species, *Journal of Food Science*, 44: C1064-C1070.
- Miletić N., Popović B., Mitrović O., Kandić M., Lepasavić A., (2014), Phenolic compounds and antioxidant capacity of dried and candied fruits commonly consumed in Serbia, *Czech Journal of Food Science* 32: 360–368.
- Monteiro S., Piçarra-Pereira M., Teixeira A., Loureiro V., Ferreira R., (2003), Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4046-4053.
- Mullen W., Stewart A., Lean M., Gardner P., Duthie G., Crozier A., (2002), Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5197-5201.
- Muñoz A., Ramos F., (2007), Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales, *Revista Horizonte Médico*, 7 (1): 23-31.
- Nacz M., Shahidi F., (2003), Phenolics in food and nutraceuticals, CRC Press.
- Nayak B., Liu R., Tang J., (2015), Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 887–918.
- Nichenametla S., Taruscio, T. G., Barney D.L., Exon J., (2006), A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 (2): 161-183.
- Ochoa M.R., Kesseler A.G., Vullioud M.B., Lozano J.E., (1999), Physical and chemical characteristics raspberry pulp: storage effect on composition and color, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32 (3): 149-153.
- Olsen H., Aaby K., Borge G., (2009), Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. *Convar. acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2816–2825.
- Osorio C., Acevedo B., Hillebrand S., Carriazo J., Winterhalter P., Morales A.L., (2010), Antioxidant activity of anthocyanin-rich Colombian tropical fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6977–6985.
- Osorio C., Carriazo J., Almanza O., (2011), Antioxidant activity of corozo (*Bactris guineensis*) fruit by electronparamagnetic resonance (EPR) spectroscopy, *European Food Research and Technology*, 233: 103–108.

- Oszmianiski J., Wojdyl A., Kolniak J., (2009), Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity, and turbidity of cloudy apple juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7078–7085.
- Padayatty S., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J., Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M, (2003), Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1): 18-35,
- Padilla-Zakour O., (2008), Microbiologically Safe Foods: Chapter 20: Good Manufacturing Practices, John Wiley & Sons, New Jersey.
- Patras A., Brunton N.P., Butler F., Donnell C., Tiwari B., (2010), Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21 (1): 3-11.
- Patthamakanokporn O., Puwastien P., Nitithamyong A., Sirichakwal P., (2008), Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 241-248.
- Peña-Varela G., Salinas-Moreno Y., Ríos-Sánchez R., (2006), Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 159-163.
- Penniston K., Nakada S., Holmes R., Assimosis D., (2008), Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products, *Journal of Endourology* 22(3): 567–570.
- Pilnik W., Voragen A.G., (1991), The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing, in Food Enzymology, (1ed) by Fox PF, London and New York, Elsevier Applied Science, pp, 303–336.
- Price M.L., Butler L.G., (1977), Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25:1268–1273.
- Prior R., Wu X., Schaich K., (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Proteggente A., Pannala A.S, Paganga G., Van Buren G., Wagner E., Wiseman S., Van de put F., Acombe C., Rice-Evans C., (2002), The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition, *Free Radicals Research*, 36 (2): 217–233.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L., (2011), Plant Polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 586-621.

- Quintanar M., Calderón J., (2009), La capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones, *Revista de educación bioquímica*, 28: 89-101.
- Radovanović B.C., Anđelković A.S.M., Radovanović A.B., Anđelković M.Z., (2013), Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12: 813–819.
- Reglamento Técnico Centroamericano RTCA (2011) 64.01.60:10 Etiquetado Nutricional Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la población a partir de 3 años, Nº 37100-COMEX-MEIC-S.
- Ribeiro D., Henrique S., Oliveira L., Macedo G., Fleuri L., (2010), Enzymes in juice processing: a review, *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 635–641.
- Rivas G., García A., (2002), Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante, *Alimentación, Nutrición y Salud*, 9: 31-38.
- Robards K., Prenzler P., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., (1999), Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- Rojano B., Zapata I., Cortes B., (2012), Anthocyanin stability and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values of Corozo aqueous extracts (*Bactris guineensis*), *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (3): 244-255.
- Rojas-Garbanzo C., Pérez A.M., Vaillant F., Pineda-Castro M.L., (2016), Physicochemical and antioxidant composition of fresh peach palm (*Bactris gasipaes Kunth*) fruits in Costa Rica, *Brazilian Journal of Food Technology*, 19: 1-9.
- Rojas-Garbanzo C., Zimmermann B.F., Schulze-Kaysers N., Schieber A., (2017), Characterization of phenolic and other polar compounds in peel and flesh of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') by ultra-high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection, *Food Research International*, 100: 445–453.
- Rosa F., Arruda A., Siqueira E., Arruda S., (2016) Phytochemical compounds and antioxidant capacity of tucum-do-cerrado (*Bactris setosa* Mart), *Brazil's Nutrients*, 8: 110.
- Rubinskiene M., Jasutiene I., Rimantas P., Viskelis P., (2005), HPLC determination of the composition and stability of blackcurrant anthocyanins, *Journal of Chromatographic Science*, 43: 478-482.
- Rufino M., Alves R., De Brito E., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., Mancini-Filho J., (2010), Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil, *Food Chemistry*, 121: 996–1002.
- Russell J.B., (1992), Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling, *Journal of Applied Microbiology*, 73: 363-370.

- Sadilova E., Stintzing F.C., Carle R., (2006) Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins, *Journal of Food Science*, 71: 504-512.
- Scheible W., Gonzalez-Fontes A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M., Stitt M., (1997), Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco, *Plant Cell*, 9(5): 783-798.
- Shan S., Li J., Wu J., Zhang S., (2011), Characteristics of organic acids in the fruit of different pear species, *African Journal of Agricultural Research*, 6 (10):2403-2410.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M., (1999), Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Skrede G., Wrolstad R.E., Durst R.W.,(2000), Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Food Science* 65:357-64.
- Stewart J.R., Artime M.C., O'Brian C.A., (2003), Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *Journal of Nutrition*, 133: 2440S-2443S.
- Szajdek A., Borowska E.J., (2008), Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review, *Plant Foods for Human Nutrition*, 63:147-156.
- Tapre A. R, Jain R.K., (2014), Pectinases: Enzymes for fruit processing industry International, *Food Research Journal*, 21(2): 447-453.
- Tavares L., Figueira I., Macedo D., McDougall G., Leitão M., Vieira H., Stewart D., Alves P., Ferreira R., Santos C., (2012), Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus sp.*) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion, *Food Chemistry*, 131: 1443-1452.
- Torre L., Barri B., (2006), Quantitative evaluation of rubus fruit anthocyanin pigments, *Journal of Food Science*, 42: 488-490.
- Tsao R., (2010), Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2: 1231-1246.
- Vaillant F., Pérez A., Dávila I., Dornier M., Reynes M., (2004), Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus sp.*), *Fruits*, 60 (1): 1-10.
- Veljković J.N., Pavlović A.N., Mitić S.S., Tošić S.B., Stojanović G.S., Kaličanin B.M., Stanović D.M., Stojković M.B., Mitić M.N., Brčanović J.M., (2013), Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: Spectrophotometrical and electrochemical approaches, *Journal of Food and Nutrition Research*, 52: 12-24.
- Vinson J., Su X., Zubik L., Bose P., (2001), Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5315-5321.

- Wang H., Cao G., Prior R., (1996), Total antioxidant capacity of Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701-705.
- Wang H., Cao G., Prior R., (1997), Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 304-309.
- Wang S., Meckling K., Marccone M., Kakuda Y., Tsao R., (2011), Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? *Food Research International*, 44: 2545-2554.
- Wang W.D., Xu S.Y., Jin M.K., (2008), Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice, *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2342–2349.
- Waterman P. G., Mole S., (1994), Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 66-103
- Wu X., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R., (2004b), Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4026-4037.
- Wu X., Gua L., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Beecher G., Prior R., (2004a), Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 407–422.
- Zern T.L., Fernandez M.L., (2005), Cardioprotective effects of dietary polyphenols, *Journal of Nutrition*, 135: 2291–2294.

9 Anexos

9.1 Anexo 1. Determinación de las medidas físicas del fruto

